

MARIA LUCIA ALVES PEDROSO

**AVALIAÇÃO,
ACOMPANHAMENTO LABORATORIAL
E ANÁLISE CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA
DA PRESENÇA DE ANTICORPOS E RNA DO VÍRUS DA HEPATITE C
EM DOADORES DE SANGUE ANTI-VHC ELISA POSITIVOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Medicina Interna do Departamento de Clínica Médica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná.

Prof. Orientador: **Edna Strauss**

CURITIBA

1993

MARIA LÚCIA ALVES PEDROSO

**AVALIAÇÃO,
ACOMPANHAMENTO LABORATORIAL
E ANÁLISE CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA
DA PRESENÇA DE ANTICORPOS E RNA DO VÍRUS DA HEPATITE C
EM DOADORES DE SANGUE ANTI-VHC ELISA POSITIVOS**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Medicina do Departamento de Clínica Médica, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Edna Strauss
Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Celso Granato
Escola Paulista de Medicina

Prof. Dr. Olival Leitão
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 11 de setembro de 1993.

Dedico este trabalho

Ao Dr. Reginaldo Werneck Lopes

A meus avós (Iracema e Sebastião)

A meus pais

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a colaboração de todas as pessoas que contribuíram à elaboração deste trabalho, particularmente a:

Edna Strauss
Christian Trépo
Concepción Alonso
Ludmila Vitvitski
Rosa Maria Pedroso Xavier
Reginaldo Werneck Lopes
Antônia Schwinden
Jean Christian Chèvre.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
RÉSUMÉ	xiii
REVISÃO DA LITERATURA	1
1 HISTÓRICO DA HEPATITE NÃO A NÃO B	2
2 IDENTIFICAÇÃO DO VÍRUS DA HEPATITE C	4
3 CARACTERÍSTICAS DO VHC	6
4 MÉTODOS DE DETECÇÃO DO VÍRUS DA HEPATITE C	8
4.1 PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-VHC	8
4.1.1 Primeiros testes desenvolvidos (testes de primeira geração)	8
4.1.2 Testes atuais (testes de segunda ou terceira geração)	10
4.2 DETECÇÃO DO RNA VIRAL	12
4.3 MARCADORES INDIRETOS DA HEPATITE NÃO A NÃO B	15
5 EPIDEMIOLOGIA DA HEPATITE C	16
5.1 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA	16
5.2 SEROPREVALÊNCIA	16
5.3 MODOS DE TRANSMISSÃO	17
5.3.1 Transmissão pós-transfusional	17
5.3.2 Transmissão percutânea	19
5.3.3 Outras formas de transmissão ou transmissão esporádica	20

6 ASPECTOS CLÍNICOS	21
6.1 HEPATITES AGUDAS	22
6.2 HEPATITES CRÔNICAS	23
6.3 CIRROSE	25
6.4 CARCINOMA HEPATOCELULAR	25
7 TRATAMENTO	26
 INTRODUÇÃO	 28
OBJETIVOS DO TRABALHO	30
 CASUÍSTICA E MÉTODOS	 32
1 ASPECTOS GERAIS	33
2 METODOLOGIA DOS EXAMES SOROLÓGICOS EMPREGADOS	37
2.1 TESTES RELACIONADOS DIRETAMENTE À PESQUISA DO VHC	37
2.1.1 Anti-VHC ELISA (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>) ..	37
2.1.2 Anti-VHC ELISA 2ª geração (ELISA2)	41
2.1.3 Anti-VHC RIBA 2ª geração (<i>Recombinant Immunoblot Assay</i>)	42
2.1.4 PCR do vírus C (PCR VHC)	47
2.2 PESQUISA DOS MARCADORES INDIRETOS PARA HEPATITE NANB ..	52
2.2.1 Alaninoamino transferase (ALT)	52
2.2.2 Anti-HBc Total (anti-HBc)	52
2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	53
 RESULTADOS	 54
1 RESULTADOS DOS TESTES SOROLÓGICOS	55
1.1 TESTES REFERENTES À PRIMEIRA AVALIAÇÃO	55
1.2 TESTES REFERENTES À SEGUNDA AVALIAÇÃO	60

2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICAS	63
2.1 PESQUISA DA ALT E DO ANTICORPO HBc	65
2.2 PESQUISA DE CINCO FATORES DE RISCO PARA O VHC	67
 DISCUSSÃO	 72
 1 CASUÍSTICA	 73
2 DETECÇÃO DO ANTICORPO VHC PELO TESTE ELISA1	74
3 DETECÇÃO DO ANTICORPO VHC PELO TESTE ELISA2 e RIBA2 E DO RNA VHC PELO TESTE PCR	77
4 ANÁLISE CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA	86
4.1 MARCADORES INDIRETOS DA HEPATITE NÃO A NÃO B	87
4.2 FATORES DE RISCO PARA VHC	88
 CONCLUSÃO	 91
 ANEXOS	 95
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 108

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	- alanino aminotransferase
anti-HBc	- anticorpo contra o antígeno core do vírus B
ELISA1	- teste diagnóstico do VHC, do tipo ensaio imunoenzimático de primeira geração
ELISA2	- teste diagnóstico do VHC do tipo ensaio imunoenzimático de segunda geração
NANB	- não A não B
PCR VHC	- teste da reação da cadeia polimerase aplicado à pesquisa do VHC
RIBA2	- teste <i>recombinant immunoblot assay</i> de segunda geração
VHC	- vírus da hepatite C

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	- RESULTADOS DOS TESTES RIBA2 E ELISA2 APLICADOS NOS DOADORES ELISA1 POSITIVOS	56
TABELA 2	- CORRELAÇÃO ENTRE O "ÍNDICE DE POSITIVIDADE" DO TESTE ELISA2, COM O RESULTADO DOS TESTES RIBA 2 E PCR VHC	57
TABELA 3	- RESULTADOS DO TESTE PCR VHC, DE ACORDO COM O NÚMERO DOS DIFERENTES ANTICORPOS EVIDENCIADOS OU NÃO PELO TESTE RIBA2, APLICADO NOS 57 DOADORES DE SANGUE ELISA2 POSITIVOS	58
TABELA 4	- CORRELAÇÃO ENTRE O RESULTADO DO TESTE PCR VHC E A INTENSIDADE (AVALIADA EM CRUZES) DA COLORAÇÃO DAS QUATRO BANDAS ANTIGÊNICAS RESULTANTES DO TESTE RIBA2 E QUE CORRESPONDEM À PRESENÇA DOS RESPECTIVOS ANTICORPOS	60
TABELA 5	- RESULTADOS DA SEGUNDA AVALIAÇÃO DOS TESTES ELISA2, RIBA2 e PCR REALIZADOS NOS 46 DOADORES ELISA2 POSITIVOS NA PRIMEIRA AVALIAÇÃO	61
TABELA 6	- COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DOS 46 DOADORES ELISA2 POSITIVOS SUBMETIDOS AO TESTE RIBA2 E PCR VHC EM DUAS AVALIAÇÕES DIFERENTES	62
TABELA 7	- COMPARAÇÃO ENTRE OS DOADORES ELISA2, ELISA2 E RIBA2 E ELISA2, RIBA2 E PCR VHC POSITIVOS E POPULAÇÃO CONTROLE, SEGUNDO O SEXO	64
TABELA 8	- COMPARAÇÃO ENTRE OS DOADORES ELISA2, ELISA2/RIBA2, ELISA2/RIBA2/PCR VHC POSITIVOS E A POPULAÇÃO CONTROLE, SEGUNDO A IDADE	65
TABELA 9	- COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DA DOSAGEM DA ALT ENTRE OS DOADORES ELISA2, ELISA2/RIBA2 E ELISA2/RIBA2/PCR VHC POSITIVOS E A POPULAÇÃO CONTROLE, COM HISTÓRIA DE DUAS OU MAIS DOAÇÕES DE SANGUE	66
TABELA 10	- COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DA PESQUISA DO ANTICORPO HBc ENTRE OS DOADORES ELISA2, ELISA2/RIBA2, ELISA2/RIBA2/PCR VHC POSITIVOS E A POPULAÇÃO CONTROLE, COM HISTÓRIA DE DUAS OU MAIS DOAÇÕES DE SANGUE	66

TABELA 11 - COMPARAÇÃO ENTRE OS DOADORES ELISA2, ELISA2/RIBA2 E ELISA2/RIBA2/PCR VHC POSITIVOS E A POPULAÇÃO CONTROLE, SEGUNDO HISTÓRIA DE TRANSFUSÃO SANGUÍNEA	67
TABELA 12 - COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DA PRESENÇA DE PROFISIONAIS DE SAÚDE ENTRE OS DOADORES ELISA2, ELISA2/RIBA2 E ELISA2/RIBA2/PCR VHC POSITIVOS E A POPULAÇÃO CONTROLE	68
TABELA 13 - COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE HISTÓRIA DE TATUAGEM ENTRE OS DOADORES ELISA2, ELISA2/RIBA2 E ELISA2/RIBA2/PCR VHC POSITIVOS E A POPULAÇÃO CONTROLE	69
TABELA 14 - COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE HISTÓRIA DE ACUPUNTURA ENTRE OS DOADORES ELISA2, ELISA2/RIBA2 E ELISA2/RIBA2/PCR VHC POSITIVOS E A POPULAÇÃO CONTROLE	69
TABELA 15 - COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE HISTÓRIA DE TOXICOMANIA ENDOVENOSA ENTRE OS DOADORES ELISA2, ELISA2/RIBA2 E ELISA2/RIBA2/PCR VHC POSITIVOS E A POPULAÇÃO CONTROLE	70
TABELA 16 - COMPARAÇÃO DO NÚMERO DE FATORES DE RISCO PRESENTES ENTRE DOADORES COM TESTES POSITIVOS PARA VHC E A POPULAÇÃO CONTROLE	71

RESUMO

O vírus da hepatite C (VHC) foi recentemente isolado e demonstrou ser a principal causa de hepatite pós-transfusional. O objetivo do presente trabalho foi avaliar, em dois períodos distintos, doadores de sangue positivos ao teste ensaio imunoenzimático de primeira geração, para pesquisa de anticorpos contra o VHC (ELISA1), através de outros testes, com intuito de caracterizar melhor este diagnóstico. Realizou-se também análise clínico-epidemiológica e, finalmente, sugestão sobre a conduta futura a ser tomada com o grupo estudado. No período médio de setembro de 1990 a janeiro de 1992, foram avaliados 92 doadores ELISA1 positivos, no Centro de Transfusão Sanguínea de Lyon, França, através de dois testes de segunda geração, um teste do tipo ensaio imunoenzimático e outro, teste *recombinant immunoblot assay* (ELISA2 e RIBA2) para a pesquisa de anticorpos VHC, além de um teste de amplificação molecular pela técnica da *polymerase chain reaction* (PCR VHC). Pesquisaram-se ainda os marcadores indiretos para hepatite não A não B e cinco fatores de risco para o VHC. Foram encontrados 61,9% doadores ELISA2 positivos, 27,2% RIBA2 positivos e 11,9% RIBA2 indeterminados todos com anticorpo C100-3 isolado. O teste PCR VHC mostrou-se positivo em 26% dos doadores ELISA2 positivo e 84% dos casos RIBA2 positivos e esteve negativo em 81,8% dos casos RIBA2 indeterminados e 95,2% dos RIBA2 negativos. Na segunda avaliação, 58,6% dos doadores mantiveram o resultado inicial e 47% tiveram definida a negatividade dos testes. Os marcadores indiretos para a hepatite não A Não B, história de toxicomania e de tatuagem mostraram relação com a positividade dos três testes avaliados, para esta população em estudo. Em conclusão, o teste ELISA de primeira geração mostrou-se obsoleto. Houve boa relação entre o teste RIBA2 positivo e a positividade da PCR VHC ou presença de viremia, enquanto o teste RIBA2 indeterminado não sugeriu relação com infecciosidade. Na reavaliação posterior, pôde-se precisar 52% dos resultados; nos demais, a continuidade na análise sorológica poderia auxiliar a definir o diagnóstico, bem como contribuir no conhecimento do comportamento viral. Assim, sugere-se que 38% dos doadores possam retornar à doação de sangue e que nos demais se mantenha a interdição, de forma temporária ou definitiva.

ABSTRACT

The virus of "C" hepatitis was recently isolated and proved to be the main cause of post-transfusion hepatitis. This study uses other tests to make a detailed evaluation of the characteristics of positive first generation enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to hepatitis C virus (ELISA1) blood donors over two different periods of time. Clinical and epidemiological analysis were carried out and the procedure to be adopted in the future for the group studied is suggested. Two second generations assays, to test for anti-HCV enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA2) and Recombinant Immunoblot assay and a polymerase chain reaction assay to test for RNA-VHC and PCR VHC tests were used to evaluate ninety-two ELISA1-positive donors of the Blood Transfusion Center of Lyon, France, between September 1990 and January 1992, roughly. Indirect markers of NANB hepatitis and five risk factors for VHC were also investigated. The C100-3 antibody was isolated in all donors, who were 61.9% ELISA2-positive donors; 27.2% RIBA2-positive and 11.9% RIBA2-indeterminate. The PCR VHC test was positive in 26% of the ELISA2-positive donors and in 84% of the RIBA2-indeterminate cases and in 95.2% of the RIBA2-negative donors. In the second evaluation, results remained the same in 58.6% of all donors, but were negative in 47%. Indirect markers of NANB hepatitis, a history of drug abuse and tattoos were closely related to the positive results observed in the target population. ELISA1 proved to be an obsolete test. Positive RIBA2 and PCR VHC results were closely related to the presence of viremia, while the RIBA2-indeterminate test did not suggest any link with infectiousness. Fifty-two percent of the results were precise in the second reevaluation. As for the others, the continuity of serological analysis may be of assistance in the definition of diagnosis and can contribute to the knowledge of the behavior of the virus. Therefore, it is suggested that 38% of subjects can donate blood again and that the donation by others is either temporarily or permanently restricted.

RÉSUMÉ

Le virus de l'hépatite C (VHC) a été récemment isolé et il a été démontré qu'il est la cause principale de l'hépatite qui se manifeste après des transfusions sanguines. L'objectif du présent travail a été d'évaluer, dans deux périodes distinctes et à l'aide d'autres tests, des résultats obtenus à partir de donneurs de sang positifs ayant subi le test immunoenzymatic à la recherche d'anticorps contre le VHC de première génération (ELISA1), dans le but de mieux caractériser la maladie. Une analyse clinico-épidémiologique a été réalisée et on a indiqué la démarche à suivre avec le groupe étudié. Dans la période moyenne allant de septembre 1990 à janvier 1.992, on a étudié 92 donneurs ELISA1 positifs du Centre de Transfusion Sanguine de Lyon, France, à l'aide des tests de deuxième génération, immunoenzymatic et recombinant immunoblot assay pour la détection d'anticorps VHC, (ELISA2 et RIBA2) et un test d'amplification génomique par (polymerase chain reaction) (PCR VHC). On a encore fait des recherches sur les marqueurs indirects de l'hépatite NANB et sur cinq facteurs de risque pour le VHC. On a trouvé 61,9% de donneurs ELISA2 positifs, 27,2% de RIBA2 positifs et 11,9% de cas RIBA2 indéterminés tous présentant l'anticorps C100-3 isolé. Le test PCR VHC s'est montré positif pour 26% des donneurs ELISA2 positifs et pour 84% des cas RIBA2 positifs et a présenté des résultats négatifs pour 81,8% des cas RIBA2 indéterminés et pour 95,2% des cas RIBA2 négatifs. Lors d'une deuxième évaluation 58,6% des donneurs ont confirmé les résultats initiaux et pour 47% on a obtenu des résultats négatifs dans les tests. En ce qui concerne la population étudiée, on a pu établir un rapport entre les marqueurs indirects de l'hépatite NANB, antécédents de toxicomanie et de tatouage, et les résultats positifs des tests utilisés. Le test ELISA1 s'est avéré obsolète. Il y a eu un bon rapport entre le test RIBA2 positif et le caractère positif de la PCR VHC ou la présence de virus dans le sang, tandis que le test RIBA2 indéterminé n'a pas indiqué de relation avec la nature infectieuse de la maladie. Dans une réévaluation ultérieure on a pu préciser 52% des résultats, dans les autres cas la poursuite de l'analyse sérologique pourrait aider à définir le diagnostic ainsi que contribuer à la connaissance du comportement viral. On propose donc que 38% des donneurs puissent reprendre les dons de sang mais que ceux-ci restent interdits au restant des personnes, de façon temporaire ou définitive.

REVISÃO DA LITERATURA

REVISÃO DA LITERATURA

1 HISTÓRICO DA HEPATITE NÃO A NÃO B

O termo hepatite Não A Não B (NANB) passou a ser empregado a partir da década de 70, ao reconhecer-se que muitos casos de hepatite pós-transfusional (HPT) não estavam relacionados aos vírus A ou B ou a outros vírus como o citomegalovírus ou o vírus Epstein-Barr (ALTER et al., 1975; PRINCE et al., 1974).

Além de responsável pela maior parte das HPT, a Hepatite Não A Não B abrangia ampla expressão clínico-patológica, ocorrendo nas mais variadas formas, esporádica ou epidêmica (KHUROO et al., 1980; MATHIESEN et al., 1979; NORKRANS et al., 1979).

Constatou-se que a hepatite NANB era responsável por mais de 90% dos casos de hepatite pós-transfusional e caracterizava-se por ser geralmente assintomática, evoluir frequentemente (50% dos casos) para formas crônicas e destas progredir para cirrose (20% dos casos), tendo possível relação no aparecimento futuro de carcinoma hepático primário (BRUCE et al., 1985; DIENSTAG, 1983).

A incidência da hepatite NANB após transfusão sanguínea mostrou-se variável de acordo com a região. Foi estimada em 2% a 4% no norte da Europa, 15% a 20% no sul da Europa e 10% a

12% nos Estados Unidos. No Brasil, TOLEDO (1988) encontrou uma incidência de 19,5%.

Tentativas de controle desse tipo de transmissão foram instituídas em alguns bancos de sangue, através do impedimento à doação de doadores com alaninoaminotransferase (ALT) elevada e ou presença do anticorpo HBc, constatada a relação destes dois marcadores com maior risco de transmissão de Hepatite NANB (HABIBI et al., 1988; STEVENS et al., 1984). Quando usados como testes de rotina na triagem dos doadores, contribuíram na diminuição de 50% a 65% na incidência de hepatite pós-transfusional, com somente uma perda de 5% a 3,8% das doações (VAN DER POEL et al., 1990; WILLIAMS et al., 1990), embora alguns autores tenham questionado a perda substancial de doadores não infectantes (ALTER et al., 1981; HOYOS et al., 1989) e em um estudo espanhol não se tivesse observado diferença significativa na incidência de HPT-NANB entre pacientes que tinham recebido sangue triados ou não para estes marcadores (ESTEBAN et al., 1990). Um estudo brasileiro demonstrou a alta prevalência do anti-HBc em doadores de sangue e, ainda que reconhecendo ser uma prática de alto custo, recomendou a sua utilização em centros hemoterápicos mais desenvolvidos (WENDEL et al., 1991).

Apesar de praticamente uma década de vários estudos com intuito de isolar o vírus (TREPO et al., 1980; TREPO et al., 1982; TREPO et al., 1983), houve muitas dificuldades para conseguir-se o reconhecimento do agente causal. Assim mesmo, devido principalmente aos estudos realizados em chimpanzés, foi possível reconhecer alguns aspectos do vírus responsável por

grande parte das hepatites pós-transfusionais (ALTER et al., 1978; BRADLEY et al., 1985; BRADLEY et al., 1986; TABOR et al., 1978), ou seja: ele era sensível ao clorofórmio, tinha um envelope lipídico, era um RNA vírus, com menos de 80 nm de diâmetro e estava relacionado com a presença de formações tubulares membranosas dentro dos hepatócitos.

Suas características e os aspectos ultra-estruturais sugeriram pertencer à família *Togaviridae*, estando presente em baixos títulos e justificando, parcialmente, as dificuldades encontradas para determinar-se antígenos e anticorpos virais, através de métodos imunológicos convencionais.

2 IDENTIFICAÇÃO DO VÍRUS DA HEPATITE C

Com as informações obtidas pelos estudos experimentais acima citados, pela primeira vez na história da virologia, conseguiu-se identificar um agente viral diretamente pela engenharia genética, sem a caracterização anterior de um sistema de detecção antigênico, protéico ou morfológico.

Esta identificação foi fruto de uma colaboração entre o laboratório **Chiron Corporation** (M. HOUGHTON, Q. L. CHOO e G. KUO) e o laboratório de hepatites do **Center for Diseases Control**, dirigido por D. BRADLEY, nos Estados Unidos.

A fonte viral empregada para o estudo foi um elevado volume de plasma obtido de um chimpanzé infectado experimentalmente e reconhecido como altamente infeccioso para vírus NANB. Após ultracentrifugação de um *pool* plasmático em condi-

ções que permitiam a concentração viral, mesmo para os vírus de pequeno tamanho, os ácidos nucleicos, DNA e RNA, foram extraídos, desnaturados e submetidos à ação da enzima transcriptase reversa para obtenção de moléculas de DNA complementares (DNAC). Os DNAC sintetizados foram em seguida clonados em vetores de expressão, ou seja, nos bacteriófagos lambda GT11; realizou-se então a transfecção do bacteriófago em bactérias *Escherichia coli*, obtendo-se, assim, a síntese de polipeptídeos correspondentes às diferentes sequências dos nucleotídeos.

Após oito anos de esforços e estudo de mais de um milhão de clones deste banco de expressão, foi isolado um clone (C5-1-1) que produzia uma proteína reativa aos anticorpos presentes no soro de um doente sofrendo de hepatite NANB crônica. Identificou-se a presença neste clone de 155 pares de bases responsáveis pela expressão de uma proteína viral específica; este fragmento do RNA viral foi utilizado como sonda de hibridização para procura de outras cópias de genes dentro do banco de ADNc. Assim, foi selecionado um segundo e maior clone constituído de 353 pares de bases (C100-3). A especificidade destes dois clones foi demonstrada pelo fato de não hibridizarem com o DNA celular humano ou dos símios; por outro lado, estas sondas reconheciam um RNA monocatenário de 9.400 nucleotídeos presente em concentrados de partículas virais preparadas a partir do soro de chimpanzés infectados. Estes clones permitiram explorar o banco de genes e os plasmas infecciosos e conduzir em alguns meses à sequência completa do genoma viral e o desenvolvimento de testes sorológicos para avaliação da presença de infecção. Realizou-se assim a identificação de um

vírus, incluído entre os vírus NANB, que foi denominado vírus da hepatite C (VHC) (ALTER JR., 1989b; CHOO et al., 1989; CHOO et al., 1990; DIENSTAG, 1990; DOOD, 1991; GERBER, 1992; LUNEL, 1992; STRAUSS, 1990; STRAUSS, 1993; SHERLOCK, DUSHEIKO, 1991; TANG, 1991; TREPO, 1990a; TREPO 1990b; ZUCKERMAN, 1990). Um estudo realizado pouco tempo após, pela mesma equipe que alcançou a identificação viral, demonstrou que o VHC era a maior causa de Hepatite NANB em todo o mundo (KUO et al., 1989).

3 CARACTERÍSTICAS DO VHC

O vírus da Hepatite C é um RNA vírus, tendo cerca de 9.400 nucleotídeos, cordão simples e polaridade positiva (CHOO et al., 1989; TAKAMIZAWA et al., 1991). Esta sequência de nucleotídeos é responsável, em uma única fase de leitura aberta (*open reading frame* - OPD), pela síntese de um grande precursor polipeptídico com 3011 ou 3010 aminoácidos (CHOO et al., 1991; TAKAMIZAWA et al., 1991), que posteriormente se segmenta e dá origem às diferentes proteínas que compõem o vírus. Uma região terminal em 5', com 324 a 341 nucleotídeos, precede a sequência responsável pela formação do polipeptídeo acima descrito e é, segundo vários estudos (KATO et al., 1991; CHOO et al., 1991; TAKAMIZAWA et al., 1991), aparentemente a região melhor conservada do genoma do vírus C, sugerindo que esta região pode ter um papel muito importante na replicação viral. Na extremidade 3', existe uma região igualmente não relacionada com o polipeptídeo citado, apresentando entre 27 e 55 nu-

cleotídeos, dependendo da fonte do vírus.

Baseando-se nas semelhanças da sequência do RNA e de outras características em comum entre VHC e de certos togavírus, mais precisamente flavivírus, determinaram-se arbitrariamente locais potenciais de segmentação da proteína precursora, em genes estruturais e não-estruturais (HOUGHTON et al. 1991; TAKAMIZAWA et al., 1991) (figura 1 - anexo 1):

- a) genes estruturais: situados na região 5', representados pelo gene C que codifica para a proteína C (capsídeo); gene E1, E2 que codificam para as proteínas do envelope;
- b) genes não-estruturais: formado pelos genes NS1 e NS2 que codificam proteínas de função desconhecida; gene NS3 codifica a proteína NS3 que contém uma helicase e participa na replicação do RNA e uma protease que estaria relacionada à fabricação de proteínas não-estruturais a partir do polipeptídeo precursor; os produtos dos genes NS4 e NS5 não são conhecidos.

É principalmente na região 3' que o vírus da hepatite C apresenta homologia de estrutura com os Flavivírus (grupo que inclui o vírus da dengue, vírus da febre amarela) , notadamente nas regiões NS3 e NS5. Por outro lado, existem diferenças essenciais entre eles que fazem supor que o VHC teria um grau de parentesco muito distante com os Flavivírus. Alguns estudos sugerem uma relação com os Pestivírus (por exemplo, o vírus da diarréia bovina) (COLLET et al., 1988). O VHC, os Flavivírus e os Pestivírus poderiam então constituir três gêneros diferentes da família dos *Flaviviridae* (LUNEL, 1992).

Após a comparação de sequências de nucleotídeos isoladas em diferentes áreas do mundo, sabe-se atualmente que existem seis diferentes genótipos ou grupos de VHC (CHIEN, 1993).

Esta noção de subtipos do VHC pode ter várias implicações, principalmente no que concerne à patogenicidade de certos tipos, à possibilidade de infecções sucessivas ou múltiplas por diferentes tipos virais (POZZATO et al., 1991) e dificuldades no desenvolvimento futuro de uma vacina (HOUGHTON et al., 1991).

4 MÉTODOS DE DETECÇÃO DO VÍRUS DA HEPATITE C

4.1 PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-VHC

4.1.1 Primeiros testes desenvolvidos (testes de primeira geração)

Por ocasião da identificação do VHC, realizou-se o estudo da sequência nucleotídica dos clones isolados que sugeriram corresponder a uma fase de leitura aberta; assim a sequência de DNA correspondente pôde ser reconstruída e inserida em DNA de fungos junto com o gene produtor de superóxido dismutase humana (SOD), para assim facilitar a expressão de proteínas virais. Desta forma, uma proteína recombinante constituída de 154 aminoácidos da SOD e dos 363 aminoácidos da proteína viral, C100-3 derivada da região NS3/NS4 do gene viral, pôde ser obtida em grande quantidade e posteriormente fixada sobre mi-

croplacas de exame, com intuito de desenvolver-se um teste de pesquisa de anticorpos correspondentes. A técnica escolhida foi enzima imunoensaio (ELISA) e foi desenvolvida pela mesma equipe que isolou o vírus (KUO et al., 1989).

Este teste foi avaliado por uma série de autores, tendo-se concluído que: não era capaz de diferenciar uma infecção presente, de uma resolvida; necessitava longo tempo após a contaminação para ocorrer a seroconversão; não identificava todos os pacientes com VHC, ou seja, tinha baixa sensibilidade; não diferenciava um paciente infectante de outro não infectante; fornecia reações falso positivas (WEILAND, SCHVARCZ, 1992).

Um teste complementar, de imunomarcagem, chamado *recombinant immunoblot assay* (RIBA1), foi em seguida desenvolvido, pelo mesmo laboratório acima citado. Este teste permitiu a detecção qualitativa dos mesmos anticorpos pesquisados no teste ELISA1. Três antígenos diferentes foram utilizados (produzidos de forma semelhante que no teste ELISA1, por recombinação genética em fungo e fusão com a SOD): as proteínas C100-3, C5-1-1 e SOD (esta utilizada como controle, para detecção de anticorpos presentes na amostra direcionados contra ela). O RIBA é um teste qualitativo, por permitir identificar a especificidade dos anticorpos VHC, e é também semiquantitativo, visto que a intensidade da coloração produzida no exame é teoricamente proporcional à quantidade de anticorpos presentes na amostra avaliada.

Observou-se em estudos com doadores de sangue que menos da metade dos resultados positivos no teste ELISA1 era confir-

mada pelo teste RIBA1, encontrando-se uma forte correlação entre o "índice de positividade" do teste ELISA1 e o aumento das transaminases com a positividade do teste RIBA1 (ALBERTI et al., 1991; VAN DER POEL et al., 1990; WANG et al., 1991), indicando que este teste era bem mais específico que o ELISA1.

Outros laboratórios também desenvolveram testes de pesquisa de anticorpos VHC, semelhantes aos acima descrito, obtendo basicamente os mesmos tipos de resultados (MIMMS et al., 1990).

4.1.2 Testes atuais (testes de segunda ou terceira geração)

Novos testes ELISA e RIBA, ditos de segunda geração, foram lançados, permitindo evidenciar-se anticorpos dirigidos contra outras proteínas além da C100-3. Foram produzidos a partir de clones correspondentes tanto à região estrutural do VHC com a produção de proteínas C22-3 quanto à região não-estrutural NS3-NS4 com a produção das proteínas C200, C33-c.

O teste ELISA de segunda geração (ELISA2) mostrou ser mais sensível e positivar-se mais precocemente nos casos de hepatite aguda do que o teste de primeira geração (AACH et al., 1991; CHAUDHARY et al., 1991). Em geral, os anticorpos C33-c e C22-3 foram os primeiros a aparecer (LUNEL et al., 1991) e o anticorpo C22-3 foi detectável em quase 100% dos casos de hepatite C, persistindo por mais tempo que os outros, mesmo em caso de cura (MARCELLIN et al., 1991; CRAXI et al., 1991; LEON et al., 1991).

Observou-se, no entanto, que este teste pode fornecer também reações falso positivas, particularmente em doadores de sangue (WEINER et al., 1990).

Um teste RIBA de segunda geração (RIBA2) foi desenvolvido como teste de confirmação do teste ELISA2. Seu princípio é igual ao do teste de primeira geração, mas apresenta dois outros antígenos VHC: C33-c e C22-3. Demonstrou-se a boa relação entre a positividade do teste RIBA2 e a presença de infecção (VAN DER POEL et al., 1991; ROMEO et al., 1993).

A partir do isolamento do VHC, a pesquisa por testes diagnósticos eficientes começou a ser desenvolvida por diferentes serviços, de forma bastante rápida, continuando até os dias atuais a se aperfeiçoar. Para se exemplificar o progresso desta área neste curto espaço de tempo, comentam-se a seguir alguns destes avanços.

Diferentes laboratórios desenvolveram testes de triagem do VHC similares aos acima descritos, alguns utilizaram proteínas recombinantes e outros peptídeos sintéticos. Entre eles: Abbott VHC de segunda geração, pesquisa proteínas C100-3, C33-c, C22-3; teste Monoelisa, proteínas 409-1-1 e 450; entre outros. Testes de confirmação também foram criados por outros fabricantes como o teste ELISA complementar, teste Matrix, teste *immunoblot* com peptídeos sintéticos, recombinante *multi-dot immunoassay*, entre outros. A análise de 11 métodos para detecção do VHC mostrou que aqueles que utilizam antígenos recombinantes de segunda geração, têm um desempenho melhor no diagnóstico do que os testes baseados em peptídeos sintéticos (LEFN, 1993). Um novo teste de imunomarcagem, RIBA de terceira

geração (RIBA3), foi desenvolvido pelos laboratórios Ortho recentemente. Apresenta dois antígenos recombinantes (C33-c e uma proteína derivada da região NS-5) e dois peptídeos sintéticos do nucleocapsídeo (C22-3) e da região NS4 (C100-3) do gene do VHC. Este teste foi desenvolvido para ser empregado nos casos com resultado indeterminado no teste RIBA2.

Desenvolveu-se ainda um teste de pesquisa de anticorpos do tipo IgM C100-3, que se mostrou importante para detecção do VHC na fase aguda da infecção e, ainda, para indicar presença de atividade na hepatopatia crônica VHC (CLEMENS et al., 1992; BRILLANTI et al., 1992).

Uma proteína designada GOR, foi identificada por outros pesquisadores, a partir de chimpanzés infectados experimentalmente com vírus da hepatite NANB, e um teste ELISA foi também desenvolvido; embora seu significado esteja ainda em fase de pesquisa. Observou-se associação dos anticorpos GOR com hepatite NANB e a participação do anticorpo GOR na doença hepática de indivíduos ELISA1 positivos (HAYASHI, 1992; MISHIRO et al., 1990; SMRITI, 1992).

4.2 DETECÇÃO DO RNA VIRAL

Devido à concentração do RNA viral ser muito baixa no curso da hepatite pelo vírus C (BRECHOT, 1990; WEINER et al., 1990b), as técnicas diagnósticas usuais não permitiram sua detecção (HOUGHTON et al., 1991), tornando-se necessário, portanto, o emprego de métodos bem mais sensíveis como a Reação

da Cadeia Polimerase (PCR), que mostrou ser capaz de detectar o RNA do vírus C tanto no soro quanto no tecido hepático (VITVITSKY et al., 1991). Esta técnica, graças a uma polimerase termoresistente (Taq polimerase), efetua vários ciclos repetidos de síntese de DNA correspondente a uma sequência de ácidos nucleicos tomados como alvo por oligonucleotídeos complementares introduzidos na amostra em estudo. Isto acarreta uma amplificação teoricamente exponencial das sequências de DNA presentes na amostra (PERSING, 1991).

Deve-se utilizar, neste teste, oligonucleotídeos situados principalmente na região 5' terminal ou não codante do gene VHC que, por geralmente estar bem conservada entre os VHC já isolados, diminui a possibilidade de resultados falso negativos devido à heterogenicidade na sequência da estrutura viral (LAURENT et al., 1992).

Atualmente, utiliza-se a **Nested** PCR ou PCR dupla que consiste em fazer duas amplificações sucessivas, utilizando dois pares de oligonucleotídeos diferentes. Este método é ainda mais sensível e permite detectar RNA viral, mesmo que ele esteja em uma quantidade extremamente baixa (GARSON et al., 1990a).

Estudos sobre a utilização da PCR no diagnóstico do VHC indicaram que a viremia pode ser detectada dentro de poucos dias após a exposição viral, muitas semanas antes da elevação da ALT e da detecção de anticorpos virais (GARSON et al., 1990c). A PCR VHC permitiu a obtenção de informações sobre o perfil virêmico no período em que os anticorpos VHC estavam presentes mas a função hepática era normal (GARSON et al.,

1990b). Em doadores de sangue portadores de anticorpo VHC cujo teste de confirmação era negativo ou indeterminado, a detecção do RNA do VHC permitiu confirmar a positividade e retirar a dúvida diagnóstica (LAURENT et al., 1992). A PCR pôde ser usada para diagnosticar infecção pelo VHC em pacientes com hepatite crônica Não A Não B seronegativa (WEINER et al., 1990b).

O lugar preciso da PCR no diagnóstico das hepatopatias à VHC e nos doadores de sangue ainda necessita ser melhor definido. Como a PCR tem a capacidade de gerar milhões de cópias a partir de uma sequência alvo, alguns imprevistos podem ocorrer no curso do exame, exigindo cuidados rigorosos na sua elaboração. Assim, a PCR VHC está reservada para os casos em que a informação sobre o perfil VHC não possa ser obtida pelos demais testes. Isto demonstra que se necessita ainda de testes diagnósticos mais simples e rápidos, que permitam, por exemplo, a detecção de antígenos VHC, como no caso do VHB, e o conhecimento do ciclo de vida viral (LAURENT et al., 1992).

Descreve-se, atualmente, a utilização de um outro método que combinaria a sensibilidade da **Nested PCR** VHC com a especificidade da hibridização por **Southern blot**, através da hibridização não radioativa com sondas específicas de vírus da hepatite C, produzidas durante a reação PCR VHC. Permitiria uma confirmação rápida e acurada da infecção VHC, principalmente na ausência de detecção dos anticorpos pelas técnicas convencionais (GEIGER, 1992).

4.3 MARCADORES INDIRETOS DA HEPATITE NÃO A NÃO B

Discute-se ainda a realização ou não dos marcadores indiretos para hepatite NANB na triagem de doadores de sangue, devido, principalmente, à possibilidade de reconhecerem os doadores no período de janela imunológica, ou seja, período anterior a seroconversão. RICHARDS et al. (1991) justificam o risco de transmissão do VHC em doadores com anticorpo HBc pela semelhante epidemiologia entre o VHC e VHB. Uma análise da relação entre anti-VHC e os marcadores indiretos foi realizada por STEVENS et al. (1990), tendo mostrado, entre doadores de sangue com transaminases elevadas, uma taxa de anti-VHC de 8,7%, sendo que esta subiu para 55,6% quando os doadores eram também positivos para o anticorpo HBc. WILLIAMS e DODD (1990) observaram uma seroprevalência de anticorpos VHC da ordem de 2,5% quando a ALT estava aumentada, 5,3% quando havia presença de anti-HBc e 37% quando ambos marcadores indiretos estavam presentes. BIZZARO (1992), ao analisar 649 doadores, observou que 16,5% apresentavam elevação da ALT; 11,8% presença de anti-HBc; 0,9% tinham os dois marcadores e somente 0,3% evidenciaram o anticorpo VHC; estes estavam associados à transmissão de hepatite pós-transfusional, mas não mostravam relação com os outros marcadores. Conclui, portanto, que os marcadores indiretos excluíam uma taxa extremamente elevada de doadores sem prova evidente de prevenção de hepatite pós-transfusional.

5 EPIDEMIOLOGIA DA HEPATITE C

5.1 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

A distribuição geográfica do VHC ainda não é bem conhecida, embora com o aparecimento dos primeiros testes diagnósticos possa-se estimar que apresente uma distribuição mundial, a exemplo do que ocorre com o vírus da hepatite B (LUNEL, 1992).

5.2 SEROPREVALÊNCIA

A prevalência dos anticorpos VHC na população geral é avaliada grosseiramente em 1% na Europa, nos Estados Unidos e África do Sul, 0,3 a 2% na Ásia, Taiwan, mais de 1% no Japão e 10% na África negra, tendo-se encontrado prevalências mais elevadas em certas cidades africanas, embora alguns autores tenham observado a alta percentagem de resultados falso positivos destes estudos (BROUAYE et al., 1990; ELLIS et al., 1990; ESTEBAN et al., 1989; ILARDI et al., 1992; LEE et al., 1991; SHEU et al., 1993; STEVENS et al., 1990).

Entre os doadores de sangue, observou-se que a seroprevalência do anticorpo C100-3 foi maior entre doadores pagos do que voluntários e diferiu conforme a localização geográfica (MENITOVE et al., 1990; STEVENS et al., 1990). Esteve entre 0,2% a 0,5% nos países escandinavos; 0,3% no Canadá; 0,4% na Alemanha; 0,6% nos Estados Unidos; 0,63% na França; 0,9 Itá-

lia; 1,5% no Japão e 6% na África. No Brasil, em um estudo de doadores de sangue, encontrou-se 2,1% casos positivos ao teste ELISA1 (AGUELLES, JANOT, 1992; GONÇALES JUNIOR, 1991; KUHNL et al., 1989; NISHIMURA et al., 1990; SIRCHIA et al., 1990; WILLIAMS et al., 1990).

5.3 MODOS DE TRANSMISSÃO

O vírus da hepatite C transmite-se principalmente por via parenteral, embora outras formas de transmissão devam também existir, visto que aproximadamente 50% dos pacientes com hepatite por vírus C não apresentam história de exposição parenteral (BRADLEY et al., 1992; SAKAMOTO et al., 1993).

Ao todo, as principais causas conhecidas de propagação do vírus parecem ser, na Europa e nos Estados Unidos, a transfusão sanguínea e a toxicomania. A transmissão é favorecida pelo frequente estado de portador crônico assintomático encontrado na população geral (LUNEL, 1992).

5.3.1 Transmissão pós-transfusional

Este tipo de transmissão é o melhor documentado atualmente. A relação entre a positividade dos anticorpos VHC nos doadores de sangue e a infecciosidade, ou o risco de transmissão, já foi bem demonstrada por vários autores (ALTER H.J. et al., 1989; LUNEL et al., 1990; VAN DER POEL et al., 1989). O

risco de hepatite NANB pós-transfusional mostrou-se mais elevado para as pessoas que receberam produtos sanguíneos VHC (anti-C100-3) positivos do que para as que receberam produtos VHC negativos. Este risco mostrou-se ainda mais importante nos indivíduos que receberam produtos anti-C100-3 positivos com ALT aumentada (LUNEL, 1992; VAN DER POEL et al., 1990b; VAN DER POEL et al., 1991). Outros testes diagnósticos para o VHC, como o teste RIBA2 e PCR VHC, mostraram, quando positivos, relação com a infecciosidade (SIMMONS et al., 1990). ISHIGURO (1992) demonstrou que 92% dos casos de hepatite aguda pós-transfusional analisados foram positivos aos testes para detecção de anticorpos do VHC de segunda geração.

Estudos baseados em testes diagnósticos de primeira geração mostraram uma prevalência de seroconversão anti-C100-3, no curso das hepatite NANB pós-transfusional, de 27% a 89% (FEINMAN et al., 1991; HOPF et al., 1990; LEE et al., 1991; TREMOLADA et al., 1991; VAN DER POEL et al., 1989; VAN DER POEL et al., 1991; WANG et al., 1991). Estes valores apontam a possível existência de hepatite C seronegativa ou de hepatites pós-transfusionais NANB e não C. Observou-se que o teste PCR VHC pôde detectar sequências do VHC no fígado ou no soro, antes do aparecimento do anticorpo no curso de hepatite aguda pós-transfusional e também em certos casos de hepatites crônicas anti-VHC negativas (HOSODA et al., 1991; MEZZELANI et al., 1991; MOSLEY et al., 1990; WEINER et al., 1990). Parece, no entanto, que um certo número de hepatites NANB pós-transfusionais, de evolução favorável, não é decorrente do VHC (CONTRE-RAS et al., 1991; FEINMAN et al., 1991).

5.3.2 Transmissão percutânea

Este tipo de transmissão é encontrado principalmente em toxicômanos. Em muitos estudos foi apontada alta prevalência de anticorpos C100-3 neste grupo, em torno de 70% (ESTEBAN et al., 1989; EVERHART et al., 1990; RODRIGUES et al., 1992). Não parece haver uma relação entre a positividade do anticorpo VHC e a idade, a duração da toxicomania e o nível de transaminases (ESTEBAN et al., 1989).

Outro grupo de risco é representado pelos profissionais de saúde; apesar do elevado risco de exposição ao sangue, a prevalência do VHC se mostrou baixa (NAKASHIMA et al., 1993; NORRGREN et al., 1992; PEREZ et al., 1992). Muitos autores demonstraram que a infecção pelo VHC poderia ter sido transmitida por picada de agulha (CARIANI et al., 1991; KIYOSAWA et al., 1991). MITSUI (1992) encontrou um risco de transmissão do VHC através de uma simples picada de agulha contaminada por sangue com RNA do VHC, da ordem de 10%. Tatuagem (KO et al., 1992) e acupuntura são procedimentos que estariam incluídos no risco de transmissão também por esta via.

Os hemodializados apresentam uma prevalência de anticorpos C100-3 que varia de um centro de hemodiálise para outro, estando em torno de 19 a 30% . Os testes de segunda geração indicaram uma prevalência de anticorpos anti-VHC mais elevada, estando próxima a 50% (LUNEL, 1992).

Em pacientes transplantados pode ocorrer a transmissão do VHC por causas diversas, transfusional ou parenteral não transfusional (FRIEDLAENDER et al., 1990).

5.3.3 Outras formas de transmissão ou transmissão esporádica

Neste grupo, encontram-se diferentes modos de contaminação, mal definidos, sendo que, em grande parte dos casos, a via de transmissão é desconhecida. Entre as possíveis formas de transmissão, aventam-se:

- a) contaminação sexual: a transmissão sexual do vírus C parece bem estabelecida, mas pouco importante; certamente ela é menos frequente que nos casos de infecção por VHB ou HIV (BRACKMANN et al., 1993; ESTEBAN et al., 1991; GORDON, et al., 1992; PACHUCKI et al., 1991; REINUS et al., 1992). São raros os casos descritos de contaminação do cônjuge (ESTEBAN et al., 1991; LUNEL, 1992). A taxa de prevalência de anticorpos VHC mostrou-se significativamente mais importante entre as pessoas que apresentaram mais de dois parceiros nos 6 meses precedentes, ou no cônjuge de pessoa VHC positivo, ou com antecedente de hepatite, do que na população geral (ALTER M.J., 1989; 1991; VAN DOORNUN et al., 1991). A transmissão do VHC entre homossexuais foi descrita na literatura (RICCHI et al., 1992);
- b) transmissão familiar: existem vários estudos que sugerem esta forma de transmissão (KYOSAWA et al., 1991; LEE et al., 1991). A prevalência de pessoas anti-VHC positivo mostrou-se significativamente mais elevada nos membros da família de pacientes anti-VHC positivo que em parentes de pacientes anti-VHC nega-

tivo (IDEQ et al., 1991), ou que na população geral (EVERHART et al., 1990; REESINK et al., 1990). Contaminação pela saliva foi igualmente evocada em certos estudos (ABE et al., 1991; DUSHEIKO et al., 1990; KOMIYAMA, et al., 1991) e a comprovação da presença de anticorpo VHC na urina foi observada (CONSTANTINE, 1992);

- c) transmissão materno-fetal: este tipo de transmissão tem sido frequentemente citado (REESINK et al., 1990; SOONG et al., 1991). Aventou-se que em crianças com mães HIV positivo, a contaminação pós-natal, horizontal, pelo VHC seria facilitada pela infecção HIV. LAM (1993) não observou ser este um cofator significativo para a transmissão. Entretanto, poucos casos de transmissão de filhos de mães com hepatite crônica ativa C, HIV negativo, foram observados (DEGOS et al., 1991). Este modo de contaminação poderia explicar certos casos de hepatite crônica em crianças (HSU et al., 1991) e a prevalência relativamente importante na população geral.

6 ASPECTOS CLÍNICOS

Os aspectos clínicos da hepatite C relacionam-se aos descritos para hepatite NANB, visto que possivelmente mais de 90% das Hepatites NANB se referem ao VHC, de acordo com testes de pesquisa de anticorpos virais (LUNEL, 1992).

6.1 HEPATITES AGUDAS

O diagnóstico da hepatite aguda NANB ou C se baseia ainda, em certos casos, na exclusão de outras causas de hepatite, devido ao aparecimento muitas vezes tardio dos anticorpos VHC.

As hepatites agudas NANB não são muito diferentes no seu aspecto clínico das hepatites A ou B (SHERLOCK et al., 1989). O período de incubação varia de 5 a 12 semanas em 80 a 90% dos casos (DIENSTAG et al., 1986). As formas assintomáticas e anictéricas são frequentes. Caracterizam-se por uma elevação de transaminase em média 3 a 50 vezes superior aos valores normais.

A frequência de formas assintomáticas ou com poucos sintomas explica porque as hepatites NANB são tão pouco diagnosticadas na fase aguda e frequentemente são descobertas por acaso, já na fase crônica. Das hepatites agudas, 40% a 60% evoluem para formas crônicas (DIENSTAG et al., 1983; DIENSTAG et al., 1986), definidas por uma elevação das transaminases por mais de 6 meses. Formas fulminantes muito raramente estariam associadas ao VHC (WRIGHT et al., 1991; YANAGI et al., 1991).

Ao serem reunidos os resultados de várias enquetes pós-transfusionais, a prevalência de seroconversão anti-C100-3 no curso de hepatite aguda pós-transfusional NANB mostrou-se em torno de 60%. Já a prevalência do anticorpo C100-3 nas hepatites agudas esporádicas foi da ordem de 26% nos casos de hepatite resolutive e de 71% nos casos que evoluíram para cro-

nicidade (BORTOLOTTI et al., 1991).

Os testes de segunda geração detectaram os anticorpos mais precocemente que os testes de primeira geração, sendo que os primeiros anticorpos a aparecer foram o C33-c e C22-3 (VAN DER POEL et al., 1991).

Muitos autores identificaram o RNA VHC através do teste PCR VHC em soro de pacientes ou de chimpanzés com hepatite NANB aguda. (GARSON et al., 1990 a; MEZZELANI et al., 1991; WEINER et al., 1990). Na maior parte dos casos, a PCR VHC positivou-se precocemente no curso da hepatite aguda, em geral alguns dias antes do pico das transaminases e bem antes da seroconversão anti-VHC, mesmo utilizando-se testes de segunda geração (LUNEL et al., 1991a). Nos casos de cura da hepatite, a PCR mostrou-se em geral negativa assim que a ALT diminuía; nos casos de evolução crônica, mostrou-se persistentemente positiva, em toda a evolução da doença, embora se tenha observado que ela poderia igualmente negativar e após se repositivar (FARCI et al., 1991).

6.2 HEPATITES CRÔNICAS

As hepatites crônicas NANB são definidas pela existência de elevação prolongada, superior a seis meses, da ALT duas vezes o seu valor normal e após a exclusão de outras causas de hepatite crônica (DIENSTAG et al., 1983b; ROSENBAUM et al., 1984). Caracteriza-se por apresentar poucos sinais clínicos, dentre eles o mais frequente é a astenia. As hepatites crôni-

cas pós-transfusionais são as mais frequentes e, em média, 20% evoluem em 10 anos para cirrose (ALTER H.J. et al., 1975; RAKELA et al., 1979).

A prevalência de anticorpos C100-3 nestes casos mostrou-se entre 70% a 80% (ALBERTI et al., 1991b; BORTOLOTTI et al., 1991; HOPF et al., 1992) e foi mais elevada com os testes de segunda geração (CRAXI et al., 1991; MARCELLIN et al., 1991; MCHUTCHINSON et al., 1991). O estudo do perfil de anticorpos observados no teste RIBA2 mostrou que, em média, 55% dos pacientes apresentavam os quatro anticorpos avaliados. A relação entre o perfil de anticorpos encontrados no teste RIBA2 e o aspecto clínico e biológico da hepatite ainda não está clara. No entanto, parece que o anticorpo C22-3 persiste mais constantemente, mesmo no caso de cura. Isto foi bem demonstrado nos estudos com os hemodializados (LUNEL, 1992), embora a presença de anticorpos C22-3 isolado possa corresponder ao início de seroconversão VHC.

Nas avaliações da PCR VHC, muitos aspectos foram descritos na forma crônica desta infecção (FARCI et al., 1991). Nas hepatites crônicas ativas, a PCR VHC mostrou-se em geral positiva (GARSON et al., 1990a; WEINER et al., 1990) e em princípio bem correlacionada com a presença de anticorpos VHC detectáveis no teste RIBA2 e com a infecciosidade (VAN DER POEL et al., 1991). No entanto, observou-se também a PCR VHC positiva de maneira intermitente, ou mesmo negativa. A PCR é geralmente negativa nos pacientes com uma só banda de positividade no teste RIBA2, particularmente quando se trata de uma reatividade anti-C100-3 isolada (FOLLET et al., 1991). Alguns

autores descreveram casos de hepatites NANB crônicas com ausência de anticorpos VHC no teste de segunda geração, mas PCR VHC positivos, o que levantou o problema da existência de hepatites C seronegativas com, no entanto, uma replicação viral detectável pela PCR (CRISTIANO et al., 1991; FARCI et al., 1991).

6.3 CIRROSE

No curso de cirroses pós-hepatite NANB, ditas criptogênicas, a prevalência dos teste de segunda geração para os anticorpos anti-VHC seria superior a 80% (DIODATI et al., 1991).

6.4 CARCINOMA HEPATOCELULAR

O carcinoma hepatocelular (CHC) é frequentemente associado à cirrose, independente muitas vezes de sua etiologia. Casos de CHC após hepatite crônica NANB foram descritos (KEW et al., 1990; KIYOSAWA et al., 1984; RESNICK et al., 1983). Todos os autores concordam que a prevalência dos anticorpos VHC em cirrose é muito elevada (COLOMBO et al., 1989; DAZZA et al., 1990). Na França, a prevalência de anticorpos VHC detectados por teste de segunda geração, em CHC sobre cirrose, situa-se em torno de 20%. O RNA viral já foi evidenciado numa zona tumoral e não tumoral (CHOU et al., 1991). Esta prevalência relativamente importante dos anticorpos VHC nos pacientes

com CHC sugere que este vírus tenha uma participação no aparecimento do câncer primitivo do fígado, seja diretamente, seja em associação com o vírus da hepatite B ou álcool, seja simplesmente favorecendo o aparecimento de uma cirrose. Convém assinalar-se que os vírus a RNA não se integram no gene da célula hospedeira e não podem, portanto, ser diretamente oncogênicos (LUNEL, 1992).

7 TRATAMENTO

A partir de 1986 surgiram os primeiros artigos referindo a eficácia do tratamento com alfa interferon nos casos de hepatite NANB crônica (HOOFNAGLE et al., 1986). Desde então, muitos estudos clínicos controlados têm sido favoráveis a este tratamento em infecção crônica pelo VHC (CAUSSE, et al., 1991; DAVIS et al., 1989; DI BISCEGLIE et al., 1989): alguns mostraram uma taxa de normalização da ALT de 50% (TINE et al., 1991), outros, evolução com melhora das alterações histológicas (SCHVARCZ et al., 1991); outros ainda abordam a recaída no final do tratamento em cerca de 50% dos pacientes que responderam inicialmente, embora, em um estudo mais recente, tenha-se comprovado a presença de boa resposta a longo prazo (SHINDO, 1992). Um estudo realizado por VILADOMIU (1992), ainda que inicial, refere à utilização do interferon em hepatites agudas não tendo encontrado benefício a longo prazo com o tratamento.

Parece que o genótipo do VHC é um fator importante na determinação da resposta ao interferon em pacientes com hepa-

tite crônica (KANAI, 1992).

A detecção do RNA no soro do paciente tratado mostrou-se uma boa prática para avaliação do efeito da medicação antiviral (HAGIWARA, 1992).

Outros tratamentos à base de corticóide e aciclovir mostraram-se sem eficácia (PAPPAS et al., 1985; STOKES et al., 1987). Ribavirina oral apresentou resultados promissores em um estudo piloto, embora após o tratamento os níveis de transaminases tivessem voltado àqueles do período pré-tratamento (REICHARD et al., 1991). Descreveu-se um caso tratado com inosine pranobex, com resposta temporária (PROHASKA et al., 1991). Para o futuro, possivelmente composições e combinações de medicações diferentes deverão ser avaliadas para o tratamento da infecção crônica pelo VHC.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A principal causa da hepatite pós-transfusional era genericamente denominada de hepatite não A não B, por ser distinta dos vírus A, B e de qualquer outro vírus hepatotrópico. Apesar de intensa pesquisa, os métodos convencionais dificultavam a definição do agente causal, possivelmente em função da baixa concentração apresentada por este tipo de agente infeccioso.

Somente o emprego de técnicas sofisticadas permitiu a caracterização e a identificação de um agente que seria o provável responsável por essa forma de hepatite. Passava-se a reconhecer então a hepatite C. E prontamente surgiram os primeiros testes diagnósticos que foram incluídos entre os testes de rotina para a seleção de doadores de sangue.

Concomitante à evolução do reconhecimento do poder antigênico viral, novos testes foram sendo desenvolvidos, permitindo uma melhor detecção da presença desta infecção. No entanto, dada a rapidez com que esses testes surgiram, houve pouco tempo hábil para uma avaliação mais detalhada dos resultados.

Para aprofundar o significado das informações fornecidas pelos testes disponíveis, optou-se por estudar casos positivos do primeiro teste diagnóstico criado para hepatite C, comparando-o aos testes de segunda geração. E esperando con-

tribuir com a melhor caracterização do diagnóstico, ampliou-se a pesquisa com a utilização de um teste mais preciso, voltado diretamente ao RNA viral, através da técnica da PCR. Por último, complementou-se este trabalho com a análise das características clínico epidemiológicas dos casos que mantiveram a positividade.

OBJETIVOS DO TRABALHO

O objetivo fundamental do presente trabalho foi avaliar a positividade do teste ELISA 1 em uma população de doadores de sangue, através de testes de segunda geração e da pesquisa do RNA viral, com intuito de procurar caracterizá-la melhor. Na consecução deste objetivo maior, procurou-se:

- 1) comparar os resultados da avaliação sorológica dos doadores ELISA1 positivos através dos três diferentes exames e definir a validade da manutenção ou não do teste ELISA1 na triagem dos doadores;
- 2) calcular a especificidade do teste ELISA2 em relação ao teste RIBA2 e verificar a relação entre o índice de positividade do teste ELISA2 e a positividade do teste RIBA2 e PCR VHC;
- 3) calcular a especificidade do teste RIBA2 em relação ao teste PCR VHC e avaliar o significado dos resultados RIBA2 indeterminados;

- 4) analisar, cerca de um ano após, a evolução dos resultados dos mesmos três testes laboratoriais;
- 5) observar a presença de marcadores indiretos para a hepatite NANB e ou fatores de risco para o VHC entre os casos com testes ELISA2/RIBA2/PCR VHC positivos;
- 6) sugerir a conduta futura aos doadores estudados.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

CASUÍSTICA E MÉTODOS

1 ASPECTOS GERAIS

Foram estudados 92 doadores de sangue, pertencentes ao Centro de Transfusão Sanguínea (CTS), de Lyon, França, selecionados através das seguintes etapas:

- a) um total de 105.888 doadores de sangue voluntários, que compareceram ao CTS de Lyon, no período de 16 de janeiro de 1990 a 16 de janeiro de 1991, foram avaliados quanto à presença de anticorpos contra o vírus da hepatite C, através do teste anti-VHC ELISA1;
- b) desse total, 405 (0,4%) doadores apresentaram o teste positivo, ou seja, confirmação em no mínimo duas dosagens sucessivas da presença de anticorpos VHC;
- c) desses doadores, 202 (49,9% do total de casos positivos) foram convidados através de carta, por apresentarem domicílio próximo a Lyon (até aproximadamente 20 Km da sede central do CTS);
- d) desta forma, compareceram à solicitação, 92 doadores (45,5% do grupo convocado, 22,7% do total de casos positivos), que passaram a compor a população em estudo.

Entre os doadores selecionados, 84 (91,3%) eram doadores habituais, já submetidos ao menos a duas avaliações pelos

testes de rotina do Centro de Transfusão Sanguínea de Lyon, entre os quais a pesquisa dos marcadores indiretos para a hepatite NANB.

Seguindo-se as normas do CTS, todos os doadores, ao apresentarem seu teste anti-VHC positivo, foram imediatamente informados e orientados a procurar um especialista e a abster-se de futuras doações sanguíneas. Posteriormente, foram convidados a participar desta pesquisa, uma investigação ainda não normatizada pelo CTS.

O período médio entre o resultado positivo do teste anti-VHC ELISA 1 e o comparecimento do doador ao CTS para esta pesquisa foi de nove meses, portanto este estudo se iniciou durante o período em que o teste ELISA1 vinha sendo realizado.

Os 92 casos selecionados foram submetidos a um protocolo de avaliação, direcionado à pesquisa do vírus da hepatite C, composto de três itens principais (anexo 4):

- a) fatores de risco;
- b) história e exame físico;
- c) exames laboratoriais.

Os fatores de risco investigados (a) foram: transfusão sanguínea prévia, profissional da área de saúde, tatuagem, acupuntura, toxicomania endovenosa.

Foram pesquisados os seguintes dados relativos à história e ao exame físico (b): astenia, anorexia, náuseas e vômitos, icterícia, história de consumo de álcool e medicamentos, hepatomegalia, esplenomegalia, telangiectasias, aranhas vasculares e eritema palmar

Os exames laboratoriais (c) consistiram de: três testes

relacionados diretamente ao vírus C, ou seja, à pesquisa de anticorpos contra o vírus C através dos exames ELISA 2, RIBA 2 e análise da presença do RNA viral pelo método da PCR; pesquisa dos marcadores indiretos da hepatite NANB: Alanina aminotransferase (ALT) e anticorpo HBc (anti-HBc).

Todos os 92 doadores foram submetidos a esses exames, exceto aqueles com resultados ELISA2 e RIBA2 negativos que não foram avaliados pelo teste PCR VHC.

Considerou-se o aumento da ALT como um marcador indireto de hepatite NANB, quando esteve presente duas ou três vezes e acima do valor máximo de normalidade.

As características destes testes são encontradas no final deste capítulo. Eles foram em sua maior parte realizados no laboratório do Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Unité de Recherche sur les Hépatites, le Sida et les Rétrovirus Humains - U 271. Somente a pesquisa do anti-HBc e a dosagem da ALT foram feitas pelo laboratório do CTS.

De cada doador foi obtida uma amostra de 30 ml de sangue; 10 ml permaneciam no CTS para realização dos testes anti-HBc e ALT e o restante era enviado, no mesmo dia, ao laboratório do INSERM. Neste, após ser separado em soro, era sempre colocado em três tubos de ensaio diferentes. O primeiro era destinado à realização da PCR VHC; o segundo destinava-se ao teste ELISA2 e o terceiro, ao teste RIBA2.

O primeiro e o terceiro tubos eram imediatamente congelados a -20o C, até serem avaliados em quinze dias ou até um mês após. Já o segundo tubo permanecia à temperatura de +4o C

nos primeiros dias (máximo uma semana) até ser testado.

Os doadores com teste ELISA2 positivo foram reconvocados uma segunda vez, em média um ano após. Nessa ocasião foram submetidos novamente aos testes sorológicos de pesquisa do VHC. Solicitou-se também nova dosagem das transaminases, dispondo-se, assim, de três avaliações das transaminases: por ocasião do teste ELISA1; na primeira e na segunda consulta.

Ao todo, portanto, os doadores foram avaliados no período médio de setembro de 1990 a janeiro de 1992.

Um grupo de 95 casos controle foi obtido no próprio CTS, no mesmo período de seleção e submetidos ao mesmo tipo de avaliação que os pacientes deste estudo. Todos ELISA 1 e ELISA2 negativos e sem diferença significativa quanto ao sexo em relação à população em estudo. Oitenta e nove (97,8%) deles eram doadores habituais com duas ou mais doações. A idade média do grupo foi de $38,4 \pm 9$, valor este estatisticamente diferente de $44,6 \pm 11$ no grupo de 92 doadores deste trabalho.

Entre os diversos critérios de exclusão de doadores à doação sanguínea estabelecidos pelo Centro de Transfusão Sanguínea de Lyon, havia a presença de:

- a) história atual ou pregressa de toxicomania;
- b) duas elevações consecutivas da ALT, acima do limite de normalidade, e ou presença de anticorpo HBc.

Assim sendo, para analisar a presença de ALT aumentada ou de anti-HBc nos doadores deste estudo, foram excluídos os casos em primeira doação que, por nunca terem sido avaliados, apresentavam maior chance de ocorrência de anti-HBc e terem tido somente uma elevação de transaminases.

As características clínicas e todos os fatores com possível relação ao risco de infecção pelo VHC encontrados neste estudo (sexo, idade, cinco fatores de risco e inclusive os marcadores indiretos para hepatite NANB) foram agrupados como características clínico-epidemiológicas. Foram analisados de acordo com a positividade dos testes ELISA2; ELISA2/RIBA2; ELISA2/RIBA2/PCR VHC.

2 METODOLOGIA DOS EXAMES SOROLÓGICOS EMPREGADOS

2.1 TESTES RELACIONADOS DIRETAMENTE À PESQUISA DO VHC

A escolha pelos laboratórios responsáveis por estes testes deveu-se exclusivamente à disponibilidade dos mesmos na ocasião deste trabalho.

2.1.1 Anti-VHC ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

(ELISA1)

Nome e objetivos gerais: ORTHO HCV ELISA *Test System*, trata-se de um teste qualitativo, que obedece ao princípio dos testes ensaio imunoenzimático em fase líquida e tem como finalidade detectar anticorpos contra o vírus da hepatite C em soro ou plasma. Foi desenvolvido pelos laboratórios ORTHO.

Princípio do teste: O exame realiza-se em três etapas e tem como suporte para a reação o fundo de pequenas cavidades

em formato de pequenos poços, reunidos em uma disposição de microplacas, marcados com um antígeno recombinante, C100-3, específico do vírus da hepatite C.

A amostra é inicialmente diluída dentro do pocinho. Caso o anticorpo contra o vírus C esteja presente, complexos antígeno-anticorpo serão formados na superfície interna deste.

Adiciona-se, a seguir, o conjugado (imunoglobulina anti-humana marcada à peroxidase) que irá, caso o complexo antígeno/anticorpo esteja presente, fixar-se aos anticorpos específicos.

Para finalizar, um sistema de detecção enzimática composto por orto-fenilenodiamine (OPD) e peróxido de hidrogênio é adicionado. Caso o sistema antígeno/anticorpo/anticorpo ligado à peroxidase esteja presente, ocorrerá oxidação do OPD havendo o aparecimento de determinada coloração, indicativa da presença de anticorpos VHC. A densidade óptica deste produto final pode ser lida através de um leitor espectrofotométrico de microplacas.

Resumo do Protocolo do teste: Inicia-se com a distribuição de 200 microlitros de um determinado diluente a cada pocinho de exame. A seguir, os pocinhos são preenchidos com 20 microlitros sendo que nos primeiros três adicionam-se controles negativos; em dois, controles positivos e nos restantes, amostras a serem avaliadas. Um dos pocinhos deve ser preenchido de forma diferente dos demais, somente com um substrato branco. A microplaca é mantida em incubação a 37°C durante uma hora. Através de um aparelho de lavagem por aspiração, a microplaca é submetida cinco vezes a esta lavagem, com o auxílio

de um tampão PBS-polysorbate. Adicionam-se a seguir 200 microlitros de conjugado (imunoglobulina monoclonal anti-humana marcada à peroxidase) em todos os pocinhos, exceto naquele que contém o substrato branco. Mantém-se novamente em incubação a 37°C por mais uma hora. Realiza-se nova lavagem. Acrescentam-se 200 microlitros de substrato (OPD e H₂O₂) em todos os pocinhos. Incuba-se à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, por trinta minutos. Depositam-se 50 microlitros de ácido sulfúrico 4N em todos os túbulos. Realiza-se a leitura, através de um leitor espectrofotométrico de microplaca a um comprimento de onda de 490 nm ou 492 nm.

Expressão e interpretação dos resultados: Deve-se calcular, inicialmente, o valor da média dos controles negativos, a média dos controles positivos e valor *cut-off*.

Média dos controles negativos (xCN) - calculada pela soma das densidades ópticas (DO) dos controles negativos dividido por três. Estabeleceu-se que a D.O. de cada controle negativo deva ser inferior ou igual a 0,150 e superior ou igual a -0,005. Os valores situados entre 0,000 e -0,005 devem ser arredondados para 0,000. Se um destes controles estiver fora destes limites, a média deve ser calculada somente com os dois outros casos. Mas, se dois destes controles estiverem fora do intervalo estabelecido, o teste deve ser recommçado.

Média dos controles positivos (xCP) - calculada pela soma das densidades ópticas dos dois controles positivos, divididos por dois. Estabeleceu-se que a densidade óptica de cada controle positivo deva ser superior ou igual a 0,600. Os valores de cada um destes controles devem situar-se entre 0,5

e 0,15 vezes o valor da média dos controles positivos. Caso um destes valores esteja fora destes limites, o teste deve ser recomeçado.

Cut-off (CO) - é calculado através da média dos controles negativos, adicionado a uma constante preestabelecida de 0,4. Exemplo : Densidade óptica de três controles negativos, 0,04, 0,05, 0,06. A média destes valores é de 0,05. Adicionando-se 0,4 obtém-se o *cut-off* de 0,45.

Finalmente, o resultado do teste ELISA 1 é realizado de acordo com os seguintes critérios:

- a) a amostra será negativa, caso sua densidade óptica seja inferior ao *cut-off* calculado; não será necessário proceder a outro teste;
- b) a amostra será considerada inicialmente positiva, caso sua densidade óptica seja superior ou igual ao *cut-off*, devendo ser retestada em dobro antes de uma interpretação final;
- c) durante a repetição de um exame inicialmente positivo, este é considerado como realmente positivo, caso uma amostra ou as duas revelem densidades ópticas iguais ou superiores ao *cut-off* encontrado;
- d) durante a repetição de um exame inicialmente positivo, este é considerado como negativo caso as duas amostras apresentem valores inferiores ao *cut-off*.

Uma forma prática de indicar-se o resultado final calculado segundo os critérios acima discutidos, é através do cálculo de seu "índice de positividade", ou seja, pela divisão da densidade óptica encontrada com o valor do *cut-off*. Todo

resultado superior ou igual a um será positivo.

2.1.2 Anti-VHC ELISA 2ª geração (ELISA2)

Nome e objetivos gerais: ORTHO HCV ELISA Test System de segunda geração.

Foi desenvolvido posteriormente ao de primeira geração e apresenta praticamente os mesmos **objetivos, princípios e protocolo de procedimento** do outro teste. Diferencia-se basicamente por dispor de outros antígenos recombinantes do vírus da hepatite C. Ou seja, encontram-se na superfície interna dos pocinhos de exame dois tipos de antígenos, C22-3 da porção estrutural do genoma viral e C200 da região não estrutural, correspondente às proteínas C33-2 e C100-3.

Outra modificação relevante, realizada sob a forma de um adendo pouco tempo após o lançamento deste teste, diz respeito à **interpretação dos resultados**:

- a) em relação aos controles negativos, alteraram-se os limites estabelecidos às densidades ópticas, ou seja, estas devem ser inferiores ou iguais a 0,200 e não mais 0,150;
- b) já os controles positivos tiveram uma total modificação na sua avaliação. Determinou-se que, para ocorrer a validação de um exame, os dois controles positivos devem obedecer a um dos seguintes quesitos: ter densidades ópticas superiores a 0,800, dentro do limite superior de leitura do aparelho e não

se diferenciar em mais de 0,650; ter maior densidade óptica do que o limite superior de leitura do aparelho; um dos controles apresentar maior densidade óptica do que o limite superior de leitura do espectrofotômetro e o outro ter uma densidade óptica superior ou igual a 2,000;

- c) no cálculo do *cut-off* estabeleceu-se que o valor a ser adicionado à média dos controles negativos deve ser de 0,6 e não mais 0,4;
- d) estabeleceu-se ainda que, para haver a validação de uma microplaca de exame, a densidade óptica encontrada no substrato branco deve ser superior ou igual a -0,02 e inferior ou igual a 0,05;
- e) por último, determinou-se que todas as amostra com D.O. inferiores a -0,025 devem ser retestadas.

2.1.3 Anti-VHC RIBA 2ª geração (*Recombinant Immunoblot Assay* RIBA2)

Nome e objetivos gerais: CHIRON RIBA HCV Test System de segunda geração. Consiste em um exame do tipo imunomarcagem, complementar ao teste ELISA por detectar os anticorpos contra as proteínas estruturais e não-estruturais do vírus da hepatite C, no soro ou no plasma. É chamado de segunda geração por ter sido desenvolvido posteriormente a um primeiro teste, que dispunha somente de três antígenos recombinantes, enquanto este dispõe de cinco. Ou seja, C5-1-1, C100-3, C33-c, C22-3 e

superoxidismutase (SOD). Todos os antígenos do VHC, em sua obtenção pela técnica de hibridização molecular, estão fusionados à SOD. Portanto, o antígeno SOD está presente como um controle com a finalidade de detectar a presença de anticorpos contra o SOD, que não são específicos das porções do VHC.

Foi desenvolvido pelo laboratório **ORTHO Diagnostic Systems Inc.**

Princípio do procedimento: Antígenos VHC recombinantes são imobilizados sobre bandas individuais de papel de nitrocelulose, a mesma matriz usada na técnica de "Western Blots".

Inicialmente as bandas são submetidas à incubação com soro ou plasma das amostras e dos controles. Caso anticorpos contra VHC estejam presentes, estes irão reagir na banda antigênica específica. Após um período de lavagem e aspiração para remoção de anticorpos não específicos, acrescenta-se às tiras um conjugado composto por uma anti-IgG humana ligada à peroxidase. Nova fase de incubação ocorre, seguida de outra lavagem para eliminação do excesso de conjugado e uma solução contendo peróxido de hidrogênio e 4-cloro 1-naftol é adicionada. Desenvolve-se assim uma coloração azul escura nas bandas que apresentem o complexo antígeno/anticorpo. A intensidade da coloração é proporcional à quantidade de anticorpo especificamente ligado ao antígeno. Após o desenvolvimento da coloração, a reação é finalizada por decantação e lavagem. A reatividade das amostras é determinada pela comparação visual da intensidade da coloração de cada banda com o antígeno com as duas bandas controle, formadas por imunoglobulinas humanas em baixa concentração (NÍVEL I) e em alta concentração (NÍVEL II).

Resumo do protocolo do teste:

- a) primeira incubação: coloca-se 1 microlitro de solução diluente em cada frasco de exame a ser utilizado e a seguir adicionam-se 20 microlitros das amostras e dos controles. O suporte com os tubos deve ser mantido sobre um agitador e deixado em agitação moderada por 4 horas, em temperatura ambiente;
- b) lavagem: deve-se realizar aspiração e lavagem com solução tampão duas vezes em cada tubo. Transfere-se então cada tira para um mesmo recipiente (máximo de 20 tiras por recipiente), onde a lavagem com a solução tampão deve ser repetida por três vezes;
- c) conjugado: adiciona-se 1 ml de conjugado (IgG de cabra anti-humana associada à peroxidase) por tira (mínimo de 10 ml por recipiente) e deixam-se os recipientes sobre um agitador (deve-se escolher um aparelho que esteja entre a relação dos tipos aprovados para o exame, fornecida no manual do mesmo) a 110 rpm, por 30 minutos, em temperatura ambiente;
- d) segunda lavagem: despreza-se o conjugado e lavam-se as tiras por três vezes, com 60 ml de solução tampão em cada recipiente.
- e) substrato: acrescenta-se 1 ml de substrato (4-cloro-1-naftol em metanol) e coloca-se novamente sobre um agitador a 110 +/-5 rpm por 15 minutos à temperatura ambiente;
- f) lavagem final: retira-se o substrato e lavam-se as tiras por duas vezes com 60ml de água destilada ou

desionizada. As tiras devem ser transferidas para um papel absorvente, onde devem ser mantidas no escuro por 20 minutos à temperatura ambiente. A leitura dos resultados pode ser feita dentro das 3 horas seguintes.

Expressão e interpretação dos resultados: Para o teste ser válido, os critérios abaixo devem ser preenchidos:

- a) as duas bandas com níveis controle de IgG humana presentes em cada tira devem ser facilmente distinguidas a olho nu;
- b) a tira relativa ao controle positivo deve mostrar uma resposta de duas cruces (++) ou mais (conforme será descrito mais abaixo) para todas as bandas antigênicas;
- c) a tira relativa ao controle negativo deve apresentar suas bandas antigênicas com uma resposta visivelmente mais baixa que a banda com NÍVEL I controle de IgG .

Para a interpretação dos resultados é necessário primeiramente graduar a resposta de cada banda antigênica:

- a) nenhuma banda visível = negativo;
- b) banda visível; Intensidade menor que o NÍVEL I controle = indeterminado;
- c) banda visível; Intensidade igual ao NÍVEL I controle = uma cruz (+);
- d) banda visível; Intensidade maior que o NÍVEL I controle e menor que o NÍVEL II controle = duas cruces (++);

- e) banda visível; Intensidade igual ao NÍVEL II controle = três cruces (+++);
- f) banda visível; Intensidade maior que o NÍVEL II controle = quatro cruces (++++)

Uma resposta de uma cruz ou mais indica reatividade da amostra a determinado antígeno. Já a resposta em grau indeterminado é considerada como não reativa.

Interpretação propriamente dita dos resultados:

- a) a amostra é considerada NÃO REATIVA caso nenhuma banda antigênica apresente uma cruz ou em qualquer das tiras;
- b) a amostra é considerada REATIVA caso tenha uma cruz ou mais em dois quaisquer antígenos VHC recombinantes;
- c) a amostra é considerada INDETERMINADA caso apenas uma das bandas, dos antígenos VHC recombinantes, tenha uma cruz ou mais de reatividade.

A reatividade isolada na banda de SOD é considerada não reativa, porém caso exista uma reatividade (uma cruz ou mais) ao SOD associada à reatividade antigênica em uma das outras bandas, o resultado será interpretado como indeterminado e quando associado a duas ou mais bandas, será considerado reativo.

2.1.4 PCR do vírus C (PCR VHC)

Nome e objetivos gerais: *Polymerase Chain Reaction*.
Permite a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de segmentos específicos de DNA.

Princípio do teste: Realizou-se a técnica da *nested* PCR, utilizando-se duas porções de oligonucleotídeos correspondentes às regiões 5' terminal ou não codante e NS3.

Após transcrição inversa do RNA do vírus C a seu DNA complementar (DNAC), a reação pode ser iniciada e compõe-se basicamente de três etapas:

- a) consiste em uma desnaturação do DNAC de cordão duplo através da ruptura das pontes de hidrogênio a alta temperatura, resultando na liberação de dois DNAC com cordão único;
- b) duas porções de oligonucleotídeos são acopladas às sequências complementares dos dois cordões de DNA alvo desnaturado, a uma temperatura mais baixa;
- c) efetua-se a síntese dos dois cordões de DNA complementares ao DNAC alvo por extensão a partir de cada porção anteriormente acoplada, graças à DNA polimerase, em presença de trifosfato desoxiribonucleotídeo.

A repetição destas três etapas por uma série de 35 ciclos leva à produção de curtos segmentos de DNA sintetizados entre as duas porções de oligonucleotídeos, específicos da sequência inicial. Realiza-se, então, uma nova amplificação, utilizando-se agora duas porções do oligonucleotídeos relati-

vos às regiões internas dos primeiros.

Estes fragmentos de DNA podem ser visualizados através de migração sobre um gel de brometo de etídio submetido à luz ultravioleta, em uma banda de 237 e ou 300 pares de base. Eles podem ser confirmados por auto-radiografia após serem transferidos pela técnica de "Southern Blot" a uma membrana e hibridizados com uma sonda radioativa específica do VHC.

Resumo do protocolo do teste:

Extração do RNA: Em uma câmara de fluxo laminar, adicionam-se 200 microlitros de soro à solução composta por : Fenol (PH 8), clorofórmio/álcool isoamílico (24/1), guanidina, água di-etil-pirocarbonada (DPC) 0,1%. O produto final deve ser centrifugado a 14000 rt/min durante 5 minutos.

Precipitação do RNA: Ainda na câmara de fluxo laminar, recupera-se o sobrenadante, que deve ser adicionado a uma solução composta de álcool a 100% e acetato de sódio. A solução é então mantida por uma noite a -20oC.

Realiza-se nova centrifugação a 14000 rt/min por 15 minutos.

Eliminação do álcool a 100% e adição de álcool a 80%, realiza-se nova centrifugação por 5 minutos e secagem, para eliminação de todos os traços de álcool, na mesma câmara.

O RNA é colocado então em suspensão em uma solução composta por água DPC e RNasina.

Tratamento da DNase I: O RNA extraído é adicionado a uma composição formada por: RNasina, DNase I, tampão RT para transcrição inversa concentrado 5 vezes (Tris-HCL 250 mM, KCL 375 mM, DTT 50 mM, MgC 215 mM) e ditiotreitól.

A composição final é deixada a 37oC durante 30 min. A seguir é colocada a 95oC durante 10 min; depois resfriada no gelo.

Transcrição inversa: A solução precedente contendo o RNA é adicionada à outra: RNasina, tampão RT concentrado 5 vezes, dNTP (desoxinucleotídeo fosfato) 10 mM, MuLV Transcriptase Reversa 200 u, *primer* 229, 50 pM, *primer* NC, 50 pM.

A composição é colocada a 37o C durante 1 hora. Em seguida, acrescentam-se 50 microlitros de água DPC.

Primeira amplificação: Deve-se associar o DNAC obtido na etapa anterior à seguinte solução: Óleo de parafina, água DPC, dNTP 1,25 mM, tampão Taq DNA polimerase 10 vezes concentrado (KCL 500 mM, Tris-HCL pH 9, 100 mM, MgC 12,15 mM, gelatina 0,1%, triton X-100 1%), *primer* 3616B, *primer* NC 1, Taq DNA polimerase 1 a 2 unidades.

Centrifuga-se brevemente e a seguir submete-se esta solução a 35 ciclos, nesta seguinte sequência:

- a) 95oC durante 5 minutos;
- b) 37oC durante 2 minutos;
- c) 72oC durante 1 minuto;
- d) a extensão final é efetuada a 72o C durante 10 minutos.

Segunda amplificação: Adiciona-se o produto PCR obtido na etapa anterior à solução: óleo de parafina, tampão Taq DNA polimerase 10 vezes concentrado, dNTP 1,25 mM, *primer* NC3, *primer* NC4, *primer* PCR3, *primer* interno 229, Taq DNA polimerase 1 a 2 unidades.

Centrifuga-se como na etapa anterior e submete-se nova-

mente a 35 ciclos em uma sequência idêntica à realizada na primeira amplificação.

Migração sobre um gel: Preparação do gel: agarose a 2% é adicionada ao tampão TBE (Tris Borato EDTA); após serem aquecidos, recebem uma gota de Bromura de Etidium. Quando o gel adquire consistência é colocado a -40C por alguns segundos.

Uma solução composta de 15 microlitros de DNA amplificado e 5 microlitros de azul de bromofenol deverá ser colocada em pocinhos formados sobre o gel.

Uma outra solução composta de 5 microlitros de Azul de Bromofenol e 15 microlitros de PHIX Hae III irá servir como referência do peso molecular.

A migração se efetuará dentro de um recipiente contendo o tampão TBE, sobre uma tensão de 100 a 120 volts durante 1 hora.

Após a migração ter sido realizada, uma fotocópia do gel deve ser feita.

Transferência por "Southern Blot": O gel deve ser depositado em um tampão fixador (NaOH 1,5M, NaCl 1M) durante 30 minutos. Em seguida deve ser neutralizado em um tampão Tris 1M, NaCl 1,5M pH8 durante 15 minutos.

A transferência a uma membrana de nylon deve ser efetuada dentro do tampão SSC (NaCl, Citrato de sódio, água) durante 24 horas. A membrana de nylon deve ser então recuperada, secada ao ar e depois fixada sob ultravioleta.

Pré-hibridização: A membrana deve ser depositada por 2 horas a 42 C dentro do tampão formado por SSC 6 vezes concen-

trado, da solução Denhart (Ficoll, polivinilpirolidone, BSA, água), SDS (sulfato dodecil sódico à 0,2%) e SSDNA (*Sheared Salmon Sperm DNA*).

Preparação da sonda de hibridização: A sonda é marcada na extremidade 3', através do kit de marcação de DNA (Boehringer). A seguinte solução deve ser incubada por 1 hora a 37°C: primer 2584 - 2607, primer 2646 - 2665, primer NC-H, CoClCa 2, tampão, água, enzima transferase terminal, alfa P32 DCTP. A preparação é finalizada pelo EDTA 200 mM pH 8. Deve então ser colocada sobre uma coluna de gel Sefadex G 50 em suspensão dentro do tampão TE (Tris-HCL 10 mM), o conjunto é centrifugado por 5 minutos a 3000 rotações. A sonda deve ser então recuperada.

Hibridização: O meio de pré-hibridização deve ser eliminado e repostado pelo meio de hibridização formado de SSC 6 vezes concentrado, do SDS a 0,2%, do SSDNA e da sonda radioativa. A membrana é então adicionada dentro deste meio e deixada em contato em média 5 horas a 42°C sob agitação.

Auto-radiografia: Após ter-se lavado a membrana, duas vezes, com SSC 2 vezes concentrado e SDS a 0,1% por 10 minutos, lava-se novamente com o SSC 1 vez concentrado e depois mais duas vezes por 10 minutos com SDS a 0,1%. A membrana deve ser seca e depois coberta por um filme transparente que é colocado a -80°C por uma noite e então revelado.

Para diminuir os riscos de contaminação, não se empregou controle positivo e preferiu-se empregar somente um controle negativo que foi submetido a todas as etapas da PCR. Este controle negativo era constituído dos mesmos reativos que

os das amostras, embora não se tenha adicionado nenhum soro.

Expressão e interpretação dos resultados: O resultado é fornecido através da revelação do filme e é considerado positivo caso mostre a presença de banda correspondente ao RNA VHC, reconhecida através de seu peso molecular.

2.2 PESQUISA DOS MARCADORES INDIRETOS PARA HEPATITE NANB

2.2.1 Alaninoamino transferase (ALT)

Nome e princípios gerais do teste: BIOTROL ALT/TGP MONOREATIF. Determinação da ALT pela técnica da medição por ultravioleta. Valores normais (a 10 min. e 37°C): Homem = menor que 52 U/l Mulher = menor que 36 U/l (JUNG, 1976; Manual técnico BIOTROL ALT/TGP MONOREATIF).

2.2.2 Anti-HBc Total (anti-HBc)

Nome e princípios gerais do teste: IMx CORE - ABBOTT *Division Diagnostic*. Técnica de enzima imunologia de micropartícula (MEIA) para a determinação qualitativa de anticorpos totais contra o antígeno HBc (Manual técnico IMx).

2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As comparações entre as características analisadas estatisticamente neste trabalho foram obtidas através do cálculo do valor médio de uma variável contínua e sua classificação entre dois desvios padrão, ou pelo teste de qui-quadrado de Pearson com correção de Yates e teste exato de Fischer para variáveis discretas.

O nível de significância estatística estabelecido neste estudo foi $p < 0,05$.

RESULTADOS

RESULTADOS

Os resultados, dispostos em tabelas e figura, referem-se inicialmente à pesquisa dos anticorpos do vírus da hepatite C pelos testes ELISA2 e RIBA2 e à pesquisa do RNA viral pela técnica PCR. A seguir, são apresentados os resultados da análise clínico-epidemiológica.

1 RESULTADOS DOS TESTES SOROLÓGICOS

(Vide Fluxograma de Resultados - anexo 1 e Tabela de Resultados - anexo 2).

1.1 TESTES REFERENTES À PRIMEIRA AVALIAÇÃO

Entre os 92 doadores anti-VHC ELISA1 positivo que participaram deste estudo, 57 (62%) mantiveram-se positivos no teste ELISA de segunda geração (ELISA2) e 35 (38%) tornaram-se negativos.

Os casos ELISA2 negativos quando avaliados pelo teste ELISA1 apresentavam "índice de positividade" mais baixo que aqueles que se mantiveram positivos no teste ELISA2, ou seja, "índice de positividade", respectivamente, de $1,8 \pm 0,6$ e 3,0

+/-1,3, sendo esta diferença estatisticamente significativa, ($p < 0,05$).

A tabela 1 mostra os resultados do teste RIBA2 nestes dois grupos de doadores, ELISA2 positivo ou negativo. Nota-se que 43,8% dos doadores ELISA2 positivo confirmaram este resultado pelo teste RIBA2 e que todos os casos ELISA2 negativos foram igualmente negativos no teste RIBA2.

TABELA 1 - RESULTADOS DOS TESTES RIBA2 E ELISA2 APLICADOS NOS 92 DOADORES ELISA1 POSITIVOS

ELISA2	RIBA2 Pos.		RIBA2 Ind.		RIBA2 Neg.		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Positivo	25	43,8	11	19,3	21	36,8	57	61,9
Negativo	00	0,0	00	0,0	35	100,0	35	38,0
Total	25	27,2	11	11,9	56	60,9	92	100,0
.....								
Sensibilidade ELISA2: V.P./ Z (+)					25/25 = 100,0%			
Especificidade ELISA2: V.N./ Z (-)					35/67 = 52,2%			

FONTE: Centro de Transfusão Sanguínea de Lyon (França), IN-SERM-U271, 1990-92

De acordo com os resultados observados, o teste ELISA2 em relação ao teste RIBA2 apresentou sensibilidade de 100% e especificidade de 52,2% para detecção de anticorpos VHC na população em estudo.

A tabela 2 mostra que 96% dos casos RIBA2 positivos e 91,7% dos doadores PCR positivos apresentaram índice de positividade (DO/CO) ao teste ELISA2, superior ou igual a 2,9, enquanto em, respectivamente, 81% e 66,7% dos casos RIBA2 e PCR negativos este índice esteve abaixo de 2,9.

A média dos índices de positividade dos casos ELISA2 e RIBA2 positivos foi de $4 \pm 0,6$, enquanto a dos casos ELISA2 positivos e RIBA2 negativos foi de $1,8 \pm 0,9$; diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$).

A média dos índices de positividade dos casos ELISA2 e PCR VHC positivos foi de $3,8 \pm 1,0$ e a dos doadores ELISA2 positivos PCR negativos de $2,4 \pm 1,2$; diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$).

TABELA 2 - CORRELAÇÃO ENTRE O "ÍNDICE DE POSITIVIDADE" DO TESTE ELISA2, COM O RESULTADO DOS TESTES RIBA 2 E PCR VHC

"Índice de positividade" ELISA2	RIBA2						PCR			
	Pos.		Ind.		Neg.		Pos.		Neg.	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
$\geq 2,9$	24	96,0	04	36,4	04	19,0	22	91,7	11	33,3
$< 2,9$	01	4,0	07	63,6	17	81,0	02	8,3	22	66,7
TOTAL	25	100,0	11	100,0	21	100,0	24	100,0	33	100,0

FONTE: Centro de Transfusão Sanguínea de Lyon (França), INSERM U-271, 1990-92

Entre os doadores RIBA2 positivos, conforme é mostrado na tabela 3, 84,0% apresentaram PCR positivo, sendo que entre estes 66,7% tinham os quatro anticorpos VHC e todos, o anticorpo C22-3. Os quatro únicos casos RIBA2 positivos e PCR negativos apresentaram em três (75%) somente dois anticorpos, e em um, os quatro anticorpos, tendo sido o único caso em que o anti-C22-3 esteve presente com PCR VHC negativa.

TABELA 3 - RESULTADOS DO TESTE PCR VHC, DE ACORDO COM O NÚMERO DOS DIFERENTES ANTICORPOS EVIDENCIADOS OU NÃO PELO TESTE RIBA2, APLICADO NOS 57 DOADORES DE SANGUE ELISA2 POSITIVOS

RIBA2	PCR				TOTAL	
	Positivo		Negativo			
	n	%	n	%	n	%
RIBA2 Pos.						
Quatro Ac*	14	56,0	01	4,0	15	26,3
Três Ac	05	20,0	00	0,0	05	8,8
Dois Ac**	00	0,0	03	12,0	03	5,3
Dois Ac	02	8,0	00	0,0	02	3,5
RIBA2 Ind.						
Um Ac***	02	18,2	09	81,8	11	19,3
RIBA2 Neg.						
Zero Ac	01	4,8	20	95,2	21	36,8
TOTAL	24	42,1	33	57,9	57	100,0
.....						
Sensibilidade RIBA2:	V.P. / Z (+)		21/24 =		87,5%	
Especificidade RIBA2:	V.N. / Z (-)		29/33 =		87,8%	

FONTE: Centro de Transfusão Sanguínea de Lyon (França), INSERM U-271, 1990-92

* Ac corresponde a anticorpo

** Ausência de anticorpo C22-3

*** Em todos os casos, anticorpo presente C100-3

Na mesma tabela 3, nota-se que todos os casos RIBA2 indeterminados apresentaram sempre o anticorpo C100-3 como o único anticorpo presente, sendo 81,8% PCR negativos.

Entre os casos RIBA2 negativos, 95,2% foram igualmente PCR negativos.

O teste RIBA2 em relação ao teste PCR VHC mostrou uma sensibilidade de 87,5% e uma especificidade de 87,8% para detecção dos anticorpos VHC, na população em estudo.

Não se observou diferença estatisticamente significativa entre a intensidade da coloração antigênica e o resultado do teste PCR em relação aos anticorpos C100-3, C5-1-1 e C33-c pesquisados (tabela 4). Nos casos em que o anticorpo C22-3 foi evidenciado pelo teste RIBA2, encontraram-se 3 ou 4 cruces de intensidade colorimétrica e em 95,5% dos casos, PCR VHC positivos. Mostra-se, ainda na tabela 4, que entre os casos RIBA2 positivos, 92% apresentavam o anticorpo C33-c, 88% o anticorpo C22-3, 80% o anticorpo C100-3 e também 80% o anticorpo C5-1-1.

TABELA 4 - CORRELAÇÃO ENTRE O RESULTADO DO TESTE PCR VHC E A INTENSIDADE (AVALIADA EM CRUZES) DA COLORAÇÃO DAS QUATRO BANDAS ANTIGÊNICAS RESULTANTES DO TESTE RIBA2 E QUE CORRESPONDEM À PRESENÇA DOS RESPECTIVOS ANTICORPOS

RIBA2	Intens.* bandas 1 ou 2 cruces				Intens.* bandas 3 ou 4 cruces				TOTAL	
	PCR Pos. n	%	PCR Neg. n	%	PCR Pos. n	%	PCR Neg. n	%		
C 5-1-1	06	30,0	03	15,0	10	50,0	01	5,0	20	p=0,216
C100-3	06	30,0	03	15,0	09	45,0	02	10,0	20	p=0,395
C100-3**	02	18,2	07	63,6	00	0,0	02	18,2	11	p=0,654
C33	03	13,0	00	0,0	17	74,0	03	13,0	23	p=0,643
C22	00	0,0	00	0,0	21	95,5	01	4,5	22	p=0,999
TOTAL	17	17,7	13	13,5	57	59,4	09	9,4	96	

FONTE: Centro de Transfusão sanguínea de Lyon (França), INSERM - U271, 1990-92

* Intens. corresponde à intensidade

** Corresponde ao resultado RIBA indeterminado

1.2 TESTES REFERENTES À SEGUNDA AVALIAÇÃO

Dos 57 doadores com teste ELISA2 positivo, 46 (80,7%) compareceram na segunda avaliação. E, conforme é mostrado na tabela 5, entre estes doadores 76% (35/46) mantiveram o teste ELISA2 positivo; 60% deles (21/35) foram RIBA2 positivos e 76% (16/21) PCR positivos. Entre os 11 casos ELISA2 negativos, todos foram RIBA2 e PCR VHC negativos, exceto um caso que foi RIBA2 indeterminado, com presença do anticorpo C100-3.

TABELA 5 - RESULTADOS DA SEGUNDA AVALIAÇÃO DOS TESTES ELISA2, RIBA2 e PCR REALIZADOS NOS 46 DOADORES ELISA2 POSITIVOS NA PRIMEIRA AVALIAÇÃO

PCR	ELISA2 pos.						ELISA2 neg.					
	Pos.		RIBA2 Ind.		Neg.		Pos.		RIBA2 Ind.		Neg.	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Pos.	16	76,2	01	10,0	00	0,0	00	0,0	00	0,0	00	0,0
Neg.	05	23,8	09	90,0	04	100,0	00	0,0	01	100,0	10	100,0
TOTAL	21	100,0	10	100,0	04	100,0	00	0,0	01	100,0	10	100,0

FONTE: Centro de Transfusão Sanguínea de Lyon (França), INSERM - U271, 1990-92

Entre os doadores ELISA2 positivos, na comparação dos resultados obtidos na primeira e segunda avaliação dos testes RIBA2 e PCR VHC, 61% (28/46) mantiveram os mesmos pares de resultados (tabela 6).

Dos 20 doadores RIBA2 positivos na primeira avaliação, testados pela segunda vez, somente um modificou seu resultado para RIBA2 indeterminado. Este caso apresentava inicialmente dois anticorpos, C100-3 e C33-c, e posteriormente somente c100-3. A PCR manteve-se negativa nas duas avaliações.

Entre os 20 doadores RIBA2 positivos retestados, encontravam-se 3 dos 4 doadores RIBA2 positivos e PCR VHC negativos da primeira avaliação; todos mantiveram o mesmo resultado: PCR VHC negativo.

TABELA 6 - COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DOS 46 DOADORES ELISA2 POSITIVOS SUBMETIDOS AO TESTE RIBA2 E PCR VHC EM DUAS AVALIAÇÕES DIFERENTES

1ª AVALIAÇÃO	TOTAL	2ª AVALIAÇÃO			
		Resultado		Alterações	
		Mantido n	Diferente n	observadas	
RIBA2 pos/PCR pos	17	16	01	PCR neg	
RIBA2 pos/PCR neg	03	02	01	RIBA2 ind	
RIBA2 ind/PCR pos	02	01	01	RIBA2 pos/PCRneg	
RIBA2 ind/PCR neg	06	05	01	ELISA2 neg/RIBA2 neg	
RIBA2 neg/PCR pos	01	00	01	ELISA2 neg/PCR neg	
RIBA2 neg/PCR neg	17	03	14*		
TOTAL	46	27	19		

FONTE: Centro de Transfusão Sanguínea de Lyon (França), INSERM U-271, 1990-92

* Corresponde a 8 ELISA2 NEG; 4 RIBA2 IND; 1 ELISA2 NEG/ RIBA2 IND; 1 RIBA2 POS.

Um único doador inicialmente RIBA2 positivo e PCR positivo tornou-se PCR VHC negativo na segunda avaliação.

Entre 8 doadores RIBA2 indeterminados na primeira avaliação, retestados posteriormente, 75% mantiveram o mesmo resultado. Os dois únicos casos que mostraram resultado diferente na segunda avaliação, um tornou-se RIBA2 negativo e o outro, RIBA2 positivo. O primeiro negativou também o teste ELISA2 e manteve o teste PCR VHC negativo; o segundo manteve o resultado positivo do teste ELISA2, mas negativou o teste PCR VHC. Portanto, entre os dois únicos casos RIBA2 indeterminados e PCR VHC positivos encontrados na primeira avaliação, somente

um persistiu positivo na segunda.

Dos 18 doadores RIBA2 negativos na primeira avaliação, testados pela segunda vez:

- a) onze doadores eram ELISA2 positivos e RIBA2 e PCR VHC negativos na primeira avaliação; na segunda, todos mantiveram os mesmos resultados nos testes RIBA2 e PCR VHC, mas no ELISA2, 8 tornaram-se negativos;
- b) um doador era ELISA2 positivo, RIBA2 negativo e PCR positivo na primeira avaliação, posteriormente tornou-se ELISA2 e PCR VHC negativo;
- c) seis doadores ELISA2 positivos, RIBA2 negativos e PCR VHC negativos, na segunda avaliação tiveram modificação no resultado do teste RIBA2: cinco tornaram-se RIBA2 indeterminados (todos com anticorpo C100-3) sendo que um entre eles tornou-se ELISA2 negativo; um caso tornou-se RIBA2 positivo e mantendo a positividade do teste ELISA2. Todos mantiveram o resultado negativo do teste PCR VHC.

Portanto, 66,7% (12/18) mantiveram o resultado do RIBA2 negativo.

2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICAS

Nenhum dos 92 doadores avaliados apresentou sinais ou sintomas de hepatopatia, ou referiu história de uso excessivo de álcool; somente um caso referiu uso de medicação potencialmente hepatotóxica.

Entre os doadores com testes positivos ELISA2; ELISA2/RIBA2; ELISA2/RIBA2/PCR VHC, comparados à população controle:

- a) não houve diferença estatisticamente significativa em relação ao sexo e o grupo controle (tabela 7);
- b) observou-se diferença estatisticamente significativa em relação à idade (tabela 8).

Vale notar que entre o total de 8 doadores em primeira doação sanguínea, foi observada a positividade de sete casos no teste ELISA2; cinco casos nos testes ELISA2/RIBA2 e quatro nos testes ELISA2/RIBA2/PCR VHC positivos.

TABELA 7 - COMPARAÇÃO ENTRE OS DOADORES ELISA2, ELISA2 E RIBA2 E ELISA2, RIBA2 E PCR VHC POSITIVOS E POPULAÇÃO CONTROLE, SEGUNDO O SEXO

DOADORES	SEXO				TOTAL	
	Masc.		Fem.			
	n	%	n	%		
ELISA2 pos.	34	59,6	23	40,4	57	
P.Controle	61	64,2	03	35,8	95	p=0,286
ELISA2/RIBA2 pos.	15	60,0	10	40,0	25	
Controle	61	64,2	34	35,8	95	p=0,876
ELISA2/RIBA2/PCR pos	12	57,1	09	42,9	21	
Controle	61	64,2	34	35,8	95	p=0,720

FONTE: Centro de Transfusão Sanguínea de Lyon (França), INSERM U-271, 1990-92

TABELA 8 - COMPARAÇÃO ENTRE OS DOADORES ELISA2, ELISA2/RIBA2, ELISA2/RIBA2/PCR VHC POSITIVOS E A POPULAÇÃO CONTROLE, SEGUNDO A IDADE

DOADORES	IDADE MÉDIA	
ELISA2 pos.	45 +/- 11	
Controle	38 +/- 9	p= 0,005
ELISA2/RIBA2 pos.	45 +/- 12	
Controle	38 +/- 9	p= 0,001
ELISA2/RIBA2/PCR pos.	44 +/- 12	
Controle	38 +/- 9	p= 0,019

FONTE: Centro de Transfusão Sanguínea de Lyon (França), INSERM -U271, 1990-92

2.1 PESQUISA DA ALT E DO ANTICORPO HBc

Entre os 92 doadores, 14 apresentaram ALT aumentada em uma ou até três dosagens. Todos eram RIBA2 e PCR positivos, exceto um que era RIBA2 indeterminado e PCR negativo e vinha sendo tratado com medicação antidepressiva. Deste total, 6 doadores mantiveram a ALT elevada em mais de uma dosagem e todos eram ELISA2/RIBA2/PCR VHC positivos.

A presença de ALT aumentada ou anti-HBc foi maior entre os doadores com mais de duas doações sanguíneas e positividade nos testes ELISA2; ELISA2/RIBA2; ELISA2/RIBA2/PCR VHC do que entre a população controle (tabelas 9 e 10).

Somente um doador, com testes ELISA2/RIBA2/PCR VHC positivos, apresentou concomitância dos dois marcadores indiretos.

TABELA 9 - COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DA DOSAGEM DA ALT ENTRE OS DOADORES ELISA2, ELISA2/RIBA2 E ELISA2/RIBA2/PCR VHC POSITIVOS E A POPULAÇÃO CONTROLE, COM HISTÓRIA DE DUAS OU MAIS DOAÇÕES DE SANGUE

DOADORES	ALT > N1*		ALT N1*		TOTAL	
	n	%	n	%		
ELISA2 pos.	06	12,0	44	88,0	50	
Controle	02	2,1	91	97,9	93	p=0,021
ELISA2/RIBA2 pos.	06	30,0	14	70,0	20	
Controle	02	2,1	91	97,9	93	p=0,000
ELISA2/RIBA2/PCR pos.	06	35,3	11	64,7	17	
Controle	02	2,1	91	97,8	93	p=0,000

FONTE: Centro de Transfusão Sanguínea de Lyon (França), INSERM U-271, 1990-92

* Corresponde a ALT normal em duas ou três dosagens

TABELA 10 - COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DA PESQUISA DO ANTICORPO Hbc ENTRE OS DOADORES ELISA2, ELISA2/RIBA2, ELISA2/RIBA2/PCR VHC POSITIVOS E A POPULAÇÃO CONTROLE, COM HISTÓRIA DE DUAS OU MAIS DOAÇÕES DE SANGUE

DOADORES	ANTI-HBc pos.		ANTI-HBc neg.		TOTAL	
	n	%	n	%		
ELISA2 pos.	6	12,0	44	88,0	50	
Controle	0	0,0	93	100,0	93	p=0,001
ELISA2/RIBA2 pos.	4	20,0	16	80,0	20	
Controle	0	0,0	93	100,0	93	p=0,000
ELISA2/RIBA2/PCR pos.	4	23,5	13	76,5	17	
Controle	0	0,0	93	100,0	93	p=0,000

FONTE: Centro de Transfusão Sanguínea de Lyon (França), U-271, 1990-92

2.2 PESQUISA DE CINCO FATORES DE RISCO PARA O VHC

Entre os fatores de risco analisados:

- a) história de transfusão sanguínea foi observada em todos os três grupos de doadores ELISA2, ELISA2/RIBA2, ELISA2/RIBA2/PCR VHC positivos para o vírus C, embora somente no grupo de doadores ELISA2/RIBA2 positivos tenha-se encontrado uma diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (tabela 11);

TABELA 11 - COMPARAÇÃO ENTRE OS DOADORES ELISA2, ELISA2/RIBA2 E ELISA2/RIBA2/PCR VHC POSITIVOS E A POPULAÇÃO CONTROLE, SEGUNDO HISTÓRIA DE TRANSFUSÃO SANGUÍNEA

DOADORES	TRANSFUSÃO SANGUÍNEA				TOTAL	
	Presente		Ausente			
	n	%	n	%		
ELISA2 pos.	08	14,0	49	86,0	57	
Controle	05	5,3	90	94,7	95	p=0,075
ELISA2/RIBA2 pos.	05	20,0	20	80,0	25	
Controle	05	5,3	90	94,7	95	p=0,031
ELISA2/RIBA2/PCR pos.	04	19,0	17	81,0	21	
Controle	05	5,3	90	94,7	95	p=0,091

FONTE: Centro de Transfusão Sanguínea de Lyon (França), INSERM U-271, 1990-92

- b) profissionais de saúde foram encontrados entre os doadores com testes positivos para o VHC, mas sem diferença estatisticamente significativa comparada à população controle (tabela 12);

TABELA 12 - COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DA PRESENÇA DE PROFISSIONAIS DE SAÚDE ENTRE OS DOADORES ELISA2, ELISA2/RIBA2 E ELISA2/RIBA2/PCR VHC POSITIVOS E A POPULAÇÃO CONTROLE

DOADORES	PROFISSIONAL DE SAÚDE				TOTAL	
	Sim		Não			
	n	%	n	%		
ELISA2 pos.	06	10,5	51	89,5	57	p=0,263
Controle	06	6,3	89	93,7	95	
ELISA2/RIBA2 pos.	03	12,0	22	88,0	25	p=0,207
Controle	06	6,3	89	93,7	95	
ELISA2/RIBA2/PCR pos.	03	14,3	18	85,7	21	p=0,392
Controle	06	6,3	89	93,7	95	

FONTE: Centro de Transfusão Sanguínea de Lyon (França), INSERM U-271, 1990-92

- c) história de tatuagem mostrou-se presente com uma diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle nos doadores com teste ELISA2/RIBA2 e ELISA/RIBA2/PCR VHC positivos (tabela 13);
- d) acupuntura, presente entre vários doadores com testes positivos para o VHC, não mostrou uma diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (tabela 14);

TABELA 13 - COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE HISTÓRIA DE TATUAGEM ENTRE OS DOADORES ELISA2, ELISA2/RIBA2 E ELISA2/RIBA2/PCR VHC POSITIVOS E A POPULAÇÃO CONTROLE

DOADORES	TATUAGEM				TOTAL	
	Pres.		Aus.			
	n	%	n	%		
ELISA2 pos.	04	7,0	53	93,0	57	p= 0,141
Controle	02	2,0	93	98,0	95	
ELISA2/RIBA2 pos.	04	16,0	21	84,0	25	p= 0,016
Controle	02	2,0	93	98,0	95	
ELISA2/RIBA2/PCR pos.	03	14,0	18	86,0	21	p= 0,040
Controle	02	2,0	93	98,0	95	

FONTE: Centro de Transfusão Sanguínea de Lyon (França), INSERM U-271, 1990-92

TABELA 14 - COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE HISTÓRIA DE ACUPUNTURA ENTRE OS DOADORES ELISA2, ELISA2/RIBA2 E ELISA2/RIBA2/PCR VHC POSITIVOS E A POPULAÇÃO CONTROLE

DOADORES	ACUPUNTURA				TOTAL	
	Pres.		Aus.			
	n	%	n	%		
ELISA2 pos.	19	33,3	38	67,0	57	p=0,137
Controle	20	21,0	75	79,0	95	
ELISA2/RIBA2 pos.	09	36,0	16	64,0	25	p=0,196
Controle	20	21,0	75	79,0	95	
ELISA2/RIBA2/PCR pos.	08	38,0	13	62,0	21	p=0,170
Controle	20	21,0	75	79,0	95	

FONTE: Centro de Transfusão Sanguínea de Lyon (França), INSERM U-271, 1990-92

e) toxicomania foi observada entre os doadores com testes ELISA2, ELISA2/RIBA2 e ELISA2/RIBA2/PCR VHC positivos para o VHC; não se detectou na população controle (tabela 15).

TABELA 15 - COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE HISTÓRIA DE TOXICOMANIA ENDOVENOSA ENTRE OS DOADORES ELISA2, ELISA2/RIBA2 E ELISA2/RIBA2/PCR VHC POSITIVOS E A POPULAÇÃO CONTROLE

DOADORES	TOXICOMANIA				TOTAL	
	Pres.		Aus.			
	n	%	n	%		
ELISA2 pos.	04	7,0	53	93,0	57	p=0,018
Controle	00	0,0	95	100,0	95	
ELISA2/RIBA2 pos.	04	16,0	21	84,0	25	p=0,001
Controle	00	0,0	95	100,0	95	
ELISA2/RIBA2/PCR pos.	04	19,0	17	81,0	21	p=0,000
Controle	00	0,0	95	100,0	95	

FONTE: Centro de Transfusão Sanguínea de Lyon, (França), INSERM U-271, 1990-92

Entre os 57 doadores ELISA2 positivo, 46% não apresentavam qualquer um dos cinco fatores de risco pesquisados; 42% apresentavam um fator de risco isolado; 7%, dois fatores associados e 5% dos doadores tinham um máximo de três fatores de risco associados. Uma proporção semelhante foi encontrada entre os doadores ELISA2/RIBA2 e ELISA2/RIBA2/PCR VHC positivos e também na população controle, com a ressalva que nesta últi-

ma não se encontrou nenhum caso com três fatores de risco associados (tabela 16).

TABELA 16 - COMPARAÇÃO DO NÚMERO DE FATORES DE RISCO PRESENTES ENTRE DOADORES COM TESTES POSITIVOS PARA VHC E A POPULAÇÃO CONTROLE

Nº FATORES DE RISCO	FATORES DE RISCO					PERFIL VHC			Controle
	Ts.	Ps.	Tt.	Ac.	Tx.	A	B	C	
Zero	-	-	-	-	-	26	09	08	64
Um	X	-	-	-	-	04	02	01	06
Um	-	X	-	-	-	03	01	01	03
Um	-	-	X	-	-	01	01	00	04
Um	-	-	-	X	-	15	05	04	20
Um	-	-	-	-	X	01	01	01	00
Dois	X	X	-	-	-	01	00	00	02
Dois	X	-	X	-	-	01	01	01	00
Dois	X	-	-	X	-	01	01	01	00
Dois	-	-	-	X	X	01	01	01	00
Três	X	X	-	X	-	01	01	01	00
Três	-	X	X	-	X	01	01	01	00
Três	-	-	X	X	X	01	01	01	00
TOTAL	08	06	04	19	04	57	25	21	95

FONTE: Centro de Transfusão Sanguínea de Lyon, (França), IN-SERM U-271, 1990-92

Ts.= Transfusão sanguínea
Ps.= Profissional de saúde
Tt.= Tatuagem
Tx.= Toxicomania
Ac.= Acupuntura

A= ELISA2 Positivo
B= RIBA2 Positivo
C= RIBA2 e PCR Positivo

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

1 CASUÍSTICA

A transmissão de doenças infecciosas através da transfusão sanguínea é de controle difícil, embora este risco seja cada vez menor, à medida que ocorre a identificação dos agentes responsáveis através de testes diagnósticos eficientes.

Com a identificação do principal agente viral da hepatite NANB, o vírus da hepatite C, foi possível instituir medidas de controle para a causa mais frequente de hepatite pós-transfusional.

Assim, a partir de 1988 com a detecção da estrutura genética do vírus C, surgiram os primeiros testes de identificação de anticorpos, ou seja, testes enzima imunoensaio (ELISA) e testes de imunomarcagem (RIBA), bem como de detecção do RNA viral, através da técnica PCR.

Um ano antes de começar-se este estudo, instituíra-se nos Bancos de Sangue da França e entre eles no Centro de Transfusão Sanguínea de Lyon, a pesquisa do VHC como teste de rotina, pela técnica ELISA de primeira geração (ELISA1). Assim, de um total de 105.888 doadores avaliados, 405, ou seja, 0,4% foram positivos ao teste ELISA1, percentual este um pouco inferior à média observada na França, de 0,63% (AGUELLES, JANOT, 1992), e estes doadores foram informados a abster-se de

futuras doações sanguíneas.

Ao começar-se este trabalho no início de 1991, já se dispunha de um novo teste ELISA, dito de segunda geração (ELISA2), mais sensível e específico, que viria a substituir, alguns meses após, o teste de primeira geração nos Bancos de Sangue.

Com o intuito de estudar-se mais detalhadamente alguns destes doadores ELISA 1 positivos que se tornaram impedidos de novas doações sanguíneas, selecionaram-se entre os 405 doadores ELISA1 positivos aqueles com domicílio próximo à sede principal do Centro de Transfusão Sanguínea de Lyon, e estes foram convocados a participar deste trabalho. Pôde-se, assim, realizar uma avaliação diagnóstica mais minuciosa dos doadores através da realização de outros três testes relacionados diretamente ao VHC e da repetição dos mesmos alguns meses após. Entendeu-se oportuno, também, analisar as características clínico-epidemiológicas dos casos positivos, comparativamente a um grupo controle.

2 DETECÇÃO DO ANTICORPO VHC PELO TESTE ELISA1

Entre os 92 doadores ELISA1 que aceitaram fazer parte deste estudo, 38% (35/92) foram ELISA2 negativo e 61% (56/92) RIBA2 negativo, sugerindo a ocorrência de resultados falso positivos ao teste ELISA1, confirmando o que já foi observado em outros estudos (LUZZI et al., 1992; SERFATY et al., 1993), principalmente entre populações de baixa prevalência do VHC,

como a dos doadores de sangue.

Alguns autores (VAN DER POEL et al., 1990) observaram a perda da reatividade do teste ELISA1 ou sua manutenção de forma intermitente durante um determinado período de acompanhamento. CASPARI et al. (1993) evidenciaram todas as combinações possíveis de resultados positivos e negativos, um padrão tão irregular que consideraram inespecífico.

Constatou-se através de estudos diversos (FAGAN, 1991; GARSON et al., 1990a; GARSON et al., 1992) que uma baixa percentagem de casos ELISA1 positivos estava relacionada ou com a positividade do teste RIBA2, ou PCR positivo, ou com a transmissão de hepatite NANB.

Sabe-se que um fator que pode contribuir para um resultado falso positivo no teste ELISA, independente de ser de primeira ou de segunda geração, é o próprio princípio do exame, que se baseia no emprego de anticorpo anti-humano para revelar a presença de um complexo antígeno anticorpo. Portanto, caso um anticorpo se ligue a alguma proteína contaminante do antígeno pesquisado, ou seja, o antígeno VHC, este poderá reagir com o anticorpo anti-humano empregado no exame, dando resultado falso positivo, tornando necessário um teste de confirmação (BARBARA, CONTRERAS, 1991).

Descreveram-se vários fatores relacionados ao resultado ELISA1 falso positivo nos doadores de sangue mencionados, entre eles: má conservação do soro por estocagem prolongada, repetidos descongelamentos ou inativação pelo calor (SCHRUMPF et al. 1990; WONG et al., 1990), hipergamaglobulinemia (McFARLANE et al., 1990), artrite reumatóide (THEILMANN et al., 1990),

malária (ACETI et al., 1990), paraproteinemia (BOUDART et al., 1990), reação cruzada com a superóxido dismutase, um dos componentes do teste (IKEDA et al., 1990), ou ainda baixo "índice de positividade" no teste ELISA (VAN DER POEL et al., 1990; WEINER et al., 1990), pois é possível que ao tentar-se obter um teste de alta sensibilidade, o *cut-off* do mesmo tenha sido posicionado muito baixo (CASPARI et al., 1992).

Esta última justificativa é a causa mais provável dos resultados falso positivos dos doadores deste estudo, em face da observação de que o índice médio de positividade foi significativamente menor entre os casos que se tornaram negativos do que entre os que permaneceram positivos, respectivamente $1,8 \pm 0,6$ e $3,0 \pm 3$.

O teste ELISA2, por dispor de dois outros antígenos recombinantes C33-c e C22-3, detecta os anticorpos anti-VHC de forma mais precoce e em maior número que o teste de primeira geração, conforme foi constatado por vários autores (FARCI et al., 1992; GARSON et al., 1992; GIUBERTI et al., 1992; INABA et al., 1991; MATTSSON et al., 1991; McHUTCHISON et al., 1992; RODRÍGUEZ, TÉVAR et al., 1991).

Por tais motivos, o teste ELISA1 tornou-se virtualmente obsoleto, muito embora tenha sido um importante instrumento de triagem de doadores (ALTER H.J., 1992; GUMUCIO, 1992).

Desta forma, em um curto espaço de tempo, observou-se o aparecimento de um teste de detecção de doadores possivelmente transmissores do VHC, e logo a seguir houve o aumento da eficiência desta seleção através de um outro teste, com capacidade de identificar maior número de casos e de diminuir a exclu-

são de doadores quando desnecessária, devendo-se considerar a readmissão de doadores ELISA 1 falso positivos, de acordo com os testes de segunda geração (CASPARI et al., 1993).

3 DETECÇÃO DO ANTICORPO VHC PELO TESTE ELISA2 e RIBA2 E DO RNA VHC PELO TESTE PCR

Na sequência deste trabalho, constatou-se que o teste ELISA2 apresentou maior sensibilidade (100%) do que especificidade (52,2%) para o diagnóstico da presença de anticorpos VHC, em relação ao teste RIBA2, conforme comentado por CARDOSO (1992). MCHUTCHISON et al. (1992) observaram, em uma população de baixo risco de exposição ao VHC, que os casos ELISA2 positivos não confirmados pelo teste RIBA2 representavam resultados falso positivos; aventaram a possibilidade da interferência de diferentes substâncias tais como imunocomplexos ou globulinas ou mesmo a estocagem prolongada do soro, produzindo reatividade ao teste ELISA2, como descrito anteriormente por outros autores para o teste ELISA1. Observaram ainda, assim como CZAJA et al. (1992), que estes casos não tinham RNA viral detectável, ou seja, eram PCR VHC negativos e que o "índice de positividade" do teste ELISA2 era mais baixo nos casos RIBA2 negativo do que nos casos RIBA2 positivos. Esta relação entre "índices de positividade" no teste ELISA2 com o resultado do teste RIBA2 também foi encontrada neste trabalho.

Por ocasião da segunda avaliação laboratorial, entre os 46 doadores ELISA2 positivos que compareceram, 11 (23,9%) tor-

naram-se ELISA2 negativo. Nestes 11 casos, o "índice de positividade" encontrado no primeiro exame era significativamente menor do que o das outras amostras que se mantiveram positivas. Dez (90,9%) destes casos eram negativos nos testes RIBA2 e PCR VHC na primeira avaliação e, na segunda, dez mantiveram-se RIBA2 negativo e todos foram PCR negativos, sugerindo, portanto, resultado ELISA2 falso positivo, na primeira avaliação.

No tocante ao teste confirmatório de segunda geração, foram encontrados 25 (43,8%) doadores RIBA2 positivos, entre os 57 ELISA2 positivos. Cerca de um ano após, 20 doadores RIBA2 positivos foram reavaliados e 19 (95,0%) mantiveram-se positivos. Um único caso tornou-se RIBA2 indeterminado, com a presença isolada do anticorpo C100-3, sendo que inicialmente apresentava também o anticorpo C33-c; neste doador a PCR VHC foi negativa nas duas avaliações. A interpretação deste caso se torna difícil quanto à presença ou não de anticorpos VHC, embora se tenha confirmado, através da segunda avaliação, a provável ausência de infecciosidade deste doador.

O teste RIBA2 mostrou, neste estudo, ter alta sensibilidade (87,5%), bem como alta especificidade (87,8%), na detecção de anticorpos VHC, em relação ao teste PCR VHC. Comprovou-se que a sensibilidade dos testes sorológicos de pesquisa de anticorpos VHC está diretamente relacionada com o título do RNA VHC da amostra (SUGITANI et al., 1992).

Entre os 25 doadores RIBA2 positivos avaliados, 21 (84%) apresentaram PCR VHC positivo, demonstrando uma boa relação entre o resultado positivo do teste RIBA2 e a presença de viremia e provável infecciosidade, conforme descrito em uma

série de trabalhos (GARSON et al., 1992; LARSEN et al., 1992; ROMEO et al., 1993; VAN DER POEL et al., 1991). Relação esta reforçada por (EBELING et al. 1991; FAGAN, 1991), com a descrição de casos RIBA2 positivos, associados com a transmissão de hepatite pós-transfusional. Alguns autores demonstraram, ainda, que os doadores com teste RIBA2 e PCR VHC positivos apresentavam quase invariavelmente algum tipo de alteração na histologia hepática, tendo até mesmo questionado a existência de portadores do vírus C verdadeiramente sadios (ALBERT et al., 1992; ESTEBAN et al., 1991; MARTIN, 1992). Entre os 21 doadores RIBA2 e PCR VHC positivos, 14 (66,7%) apresentaram reatividade simultânea aos quatro antígenos VHC no teste RIBA2. Este padrão foi também o mais comumente encontrado entre os doadores com este tipo de resultado, analisados por LI et al. (1993). Os anticorpos C22-3 estiveram presentes em todos os casos ELISA2/RIBA2/PCR VHC positivos deste estudo e o anticorpo C33-c foi observado em 20 (95,2%). WAUMANS (1993) também encontrou o predomínio do anticorpo C22-3 em seu estudo, tendo inclusive comentado que a resposta à proteína do nucleocapsídeo era altamente sugestiva do estado de portador do vírus C. DE BEENHOUWER et al. (1992) concluem com seu estudo que, na triagem dos doadores de sangue para o VHC, a confirmação da presença de anticorpos contra C22-3 por *immunoblotting* estava fortemente associada com a presença do vírus. Nos casos ELISA2/RIBA2/PCR VHC positivos deste estudo, além de sempre encontrar-se a proteína C22-3, ela sempre esteve com reatividade alta (três a quatro cruzeiros). TONG e CODD (1992) observaram resultado semelhante, e chegaram a sugerir que a intensidade da

banda C22-3 fosse usada como guia do *status* virêmico. GARASSINI et al. (1991) comentam que a proteína C22-3 seria o componente antigênico mais sensível.

Na reavaliação efetuada posteriormente, entre os doadores inicialmente RIBA2 e PCR positivos, 94% mantiveram o mesmo resultado, demonstrando a persistência da viremia cerca de um ano após a primeira avaliação. Somente um caso tornou-se PCR VHC negativo, este doador apresentava os anticorpos C33-c e C22-3 na primeira avaliação, posteriormente demonstrou ainda a presença das proteínas C5-1-1 e C100-3, tendo mantido forte reatividade à proteína C22-3. O resultado do teste RIBA2 foi, portanto, aparentemente específico; poderia se considerar, neste caso, a presença de uma flutuação do RNA VHC ou o resultado de uma infecção passada, como aventado por NAKATSUJI et al. (1992) e CARDOSO (1992).

Somente 4 (16%) dos 25 doadores RIBA2 positivos foram PCR negativos. Entre estes, dois tinham baixa reatividade às proteínas C100-3 e C5-1-1 e, quando foram reavaliados posteriormente, mantiveram-se com os mesmos resultados. Segundo IRVING et al. (1993), por serem estas proteínas correspondentes a antígenos sobrepostos, um único anticorpo monoespecífico poderia produzir reatividade ao teste. Portanto, esta reatividade seria muito sugestiva de reação falso positiva, sobretudo quando em doadores com ausência de fatores de risco e sem evidência de ser portador viral crônico. Embora um dos doadores em questão apresentasse história de transfusão sanguínea e o outro de acupuntura, pode-se questionar a positividade do resultado do teste RIBA2. Um doador se mostrou RIBA2 positivo e

na segunda avaliação indeterminado (com anti-C100-3). Estes três casos sugerem que o clareamento do vírus ocorra através da perda gradual da reatividade dos anticorpos na ausência de estimulação antigênica continuada (GARSON, 1991; IRVING et al., 1993). O último dos 4 doadores RIBA2 positivo e PCR VHC negativo apresentou reatividade aos quatro antígenos e forte positividade dos anticorpos C22-3 e C33-c; na reavaliação meses após, repetiu a mesma reatividade aos quatro anticorpos no teste RIBA2 e então mostrou positividade ao teste PCR VHC. Portanto, o resultado negativo, inicial, do teste PCR VHC foi possivelmente falso, podendo ter estado relacionado a um erro na incorporação ou a um baixo pareamento dos oligonucleotídeos durante o procedimento do exame (CASTILLO et al., 1992; ERLICH et al., 1991).

Paralelamente, observou-se que houve 11 (19,3%) doadores RIBA2 indeterminado, entre os 57 casos ELISA2 positivos. Todos apresentaram a presença isolada do anticorpo C100-3. Este fato está provavelmente relacionado com a forma de seleção empregada neste estudo, ou seja, o teste ELISA1 que utiliza somente esta proteína na triagem dos casos. A presença isolada do anticorpo C100-3 também foi observada por COUROUCÉ et al. (1991), em 84% das amostras RIBA2 indeterminadas por eles estudadas.

No que se refere à PCR VHC, 9 (81,8%) doadores RIBA2 indeterminado foram PCR negativos e entre estes, 7 (77,8%) tinham baixa reatividade antigênica, entre uma a duas cruzes no teste RIBA2. A baixa associação dos casos anti-C100-3 isolado, com a positividade da PCR VHC, foi também observada em outros

estudos, sendo que LI et al. (1993), OKAMOTO et al. (1991) e BUSH et al. (1993) não encontraram qualquer relação entre estes dois tipos de resultados. Seis dos 9 doadores RIBA2 indeterminado e PCR VHC negativo foram reavaliados posteriormente, e 5 (83,3%) não alteraram os resultados; um único caso, na segunda avaliação, foi negativo em todos os exames de pesquisa do VHC empregados. Enfim, estas informações sugerem principalmente a presença de falsa reatividade antigênica nestes casos, tendo sido também aventada em outros estudos (ALLAIN et al., 1992; BOUDART et al., 1992; CHAN et al., 1991; CLAEYS et al., 1992; FOLLETT et al., 1991). Entre outras hipóteses para a interpretação destes casos, RIBA2 indeterminado e PCR VHC negativo, com talvez alguma relação com os resultados encontrados, poder-se-ia citar:

- a) relação com infecção passada (FOLLETT et al., 1992), embora nestes casos pudessem estar mais relacionados com a reatividade isolada dos antígenos C22-3 ou C33-c, pois parecem ser estes os últimos a desaparecer no curso de uma infecção que evolua para cura (ALLAIN et al., 1991);
- b) ou ainda, de acordo com CHAN et al. (1991), associação com variante divergente do VHC, tipo-3, embora esta hipótese tenha sido questionada por ALLAIN (1992), visto os casos analisados não terem evidenciado clínica de doença hepática e nem mostrado a comprovação de hepatite aguda pós-transfusional tipo-3, ou a transmissão do VHC.

Os dois únicos doadores RIBA2 indeterminado e PCR posi-

tivo, ao serem reavaliados, mostraram que um manteve os mesmos resultados e o outro tornou-se PCR negativo mas RIBA2 positivo, apresentando reatividade também ao anticorpo C5-1-1, embora, como já anteriormente comentado, a positividade a estes dois tipos de anticorpos, em casos PCR VHC negativos, possa ser falsa (IRVING et al., 1993). Estes doadores, RIBA2 indeterminado com RNA VHC, poderiam estar infectados pelo VHC, justificando um acompanhamento prolongado para observação do perfil viral. Neste trabalho, a mudança do resultado do teste PCR VHC observada em um doador, na segunda avaliação, pode ter sido relacionada quer seja com a perda da viremia, ou a uma reação falso positiva inicial causada por razões diversas, quer seja à contaminação, com produtos anteriormente amplificados ou por DNA exógeno (PAABO, WILSON, 1988), ocorrida durante a realização do teste.

ALLAIN et al. (1992) observaram que para melhor definição do resultado RIBA indeterminado seria necessário um estudo longitudinal cuidadoso dos pacientes e ou um estudo da infeciosidade dos pares, doadores e receptores. Até então os doadores RIBA2 indeterminados deveriam ser excluídos das doações de sangue, porém informados de que a evolução da infecção viral poderia ser benigna.

Por fim, 21 (37%) doadores restantes, entre os 57 casos ELISA2 positivos, foram RIBA2 negativos. Todos foram PCR VHC negativos, exceto um doador, mas mesmo este caso mostrou-se negativo na ocasião da segunda avaliação, tendo inclusive negativedo o teste ELISA2. Uma das tentativas de explicação da presença de RNA viral sem a constatação do anticorpo VHC, é a

de estar-se no período de janela imunológica, período entre a infecção inicial e o aparecimento de resposta imunológica; possibilidade esta improvável no caso deste estudo, visto ter havido a manutenção do resultado negativo do teste RIBA2 e a negatificação da PCR VHC, na reavaliação laboratorial cerca de um ano após. Esta modificação do resultado da PCR VHC, algum tempo após, também foi observada no estudo de ROMEO et al. (1993), que a interpretaram como uma viremia transitória ou flutuante, presente entre alguns indivíduos RIBA2 negativos. Estudos prospectivos de infecções VHC crônicas, sintomáticas, demonstraram presença de fases latentes de infecção viral, durante as quais a dosagem da ALT era normal e o RNA VHC não foi detectável através da PCR VHC, acompanhadas por períodos de níveis elevados de ALT e de viremia detectável (FARCI et al., 1991).

ROMEO et al. (1993) sugerem que a viremia em infecções assintomáticas do VHC poderiam igualmente flutuar. LAZIZI et al. (1992) e MCHUTCHISON et al. (1991) também observaram este perfil RIBA2 negativo com PCR VHC positivo, tendo SUGITANI et al. (1993) mostrado que, entre um grupo de doadores com teste PCR VHC confirmadamente positivo e com níveis elevados de ALT, mais de 32% foram negativos aos anticorpos VHC em múltiplos testes, inclusive no teste RIBA2 e ELISA2.

No doador acima citado, deve-se suspeitar ainda de uma possível contaminação do exame, que poderia ter acarretado resultado falso positivo na primeira avaliação, apesar do grande cuidado prestado durante elaboração do teste.

Entre os 17 doadores RIBA2 negativos, PCR VHC também

negativos reavaliados posteriormente, 3 mantiveram os mesmos resultados, sendo que teste ELISA2 mostrou baixos "índices de positividade", sugerindo resultado não específico. Oito tornaram-se ELISA2 negativos, demonstrando assim negatividade em todos os testes de pesquisa do VHC empregados neste trabalho. Cinco doadores RIBA2 negativos tornaram-se RIBA2 indeterminados na segunda avaliação, sendo que em todos o único anticorpo presente foi o C100-3; quatro destes doadores tiveram baixa intensidade de coloração nas bandas antigênicas, ou seja, menor que três cruces, e um caso tornou-se também ELISA2 negativo, dados estes que sugerem falsa reatividade, conforme já foi discutido anteriormente neste estudo. Houve um caso que se tornou RIBA2 positivo na segunda avaliação, embora os anticorpos evidenciados tenham sido o C100-3 e C5-1-1, cada um com somente uma cruz de intensidade de coloração antigênica, sugerindo reação falso positiva, como já foi comentado neste trabalho (IRVING et al., 1993).

Assim, ao todo, entre os 57 doadores ELISA2 positivo, 24 (42,1%) apresentaram teste PCR VHC positivo. Observou-se, como para o teste RIBA2, uma relação entre os "índices de positividade" mais altos do teste ELISA2 com a positividade do teste PCR VHC. O RNA VHC detectado pela PCR, geralmente associado à presença de viremia, segundo FAGAN (1991), seria o padrão "ouro", capaz de averiguar a infecciosidade ao VHC, evidenciando diretamente a sua estrutura genética, com o potencial de detectar concentrações muito baixas do vírus. Não se poderia excluir, porém, a associação com possível presença de vírus neutralizados ou com estrutura genética defectiva. De-

ve-se considerar também a possibilidade de resultados falso positivos, devidos principalmente à contaminação com moléculas não específicas, e falso negativos, devidos à destruição do RNA seja por descongelamentos repetidos, seja por enzimas específicas. Todavia, todos esses pacientes devem ser considerados como potencialmente infectantes (ESTEBAN et al., 1991b; YOUSUF et al., 1992; YUN et al., 1993). A presença do RNA VHC seria um sensível e específico marcador da presença de doença hepática em indivíduos com anticorpos VHC, independente dos valores da ALT segundo ALBERTI et al. (1992).

4 ANÁLISE CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA

Conforme é o habitual entre os casos de hepatite C forma aguda ou crônica, todos os doadores com testes positivos para o vírus C foram assintomáticos e sem sinais sugestivos de hepatopatia, assim como a população controle (LUNEL, 1992).

Não se observou haver predomínio de um dos sexos entre os doadores com testes positivos para o VHC.

Os doadores com testes positivos para o VHC eram mais velhos que a população controle, sendo que foi mantida, portanto, a idade inicialmente observada. Como se trata de uma população adulta exposta aos mesmos fatores de risco, a diferença na idade não atuou de forma decisiva na presença ou não do vírus. Da mesma forma, alguns estudos não observaram influência da idade na presença ou não do anticorpo do VHC (COPARDO et al., 1992; FLOREANI et al., 1992).

4.1 MARCADORES INDIRETOS DA HEPATITE NÃO A NÃO B

Ao se avaliar a presença dos marcadores indiretos da hepatite NANB, ALT elevada e presença de anticorpo HBc, entre os doadores com mais de uma doação sanguínea e com positividade aos testes diagnósticos ao VHC, foi confirmada a relação entre a presença destes marcadores e a positividade para o VHC nos exames, quando comparados com uma população controle, conforme descrito pela literatura (LIN et al., 1992; SERFATI et al., 1993; ZAAIJER et al., 1993).

Ao se avaliar a presença de doadores com ALT elevada entre os doadores deste estudo, observou-se que a maior parte dos casos (92,8%) era positiva aos testes ELISA2, RIBA2 e PCR VHC. Somente 1 (7,1%) doador foi RIBA2 indeterminado e PCR VHC negativo, sendo que neste a elevação da ALT pode ter sido relacionada com o uso de uma medicação.

Entre os doadores com ALT elevada pelo menos uma vez, observou-se 92,8% de casos com teste PCR VHC positivo, vindo de encontro com o estudo de ROMEO et al. (1991) que também observaram a concomitância de testes ELISA1 positivo e ALT elevado com a presença de viremia. ROMEU et al. (1993) observaram, posteriormente, que todos os casos PCR VHC positivos com ALT elevada apresentariam altos títulos do vírus, sugerindo correlação com presença de agressão hepática.

Todavia se encontrou um número pouco elevado de casos com estes marcadores positivos, ou seja, entre os 50 casos submetidos a duas ou mais doações e que eram ELISA2 positivos, houve 6 (12%) com ALT acima do limite de normalidade em

duas ou mais dosagens, outros 6 (12%) casos com anticorpo HBc e somente 1 (1,7%) dentre eles tinha os dois marcadores ao mesmo tempo. A frequência de doadores com ALT elevada, entre os doadores ELISA2 e RIBA2 positivo, foi de 20% tendo sido, portanto, menor do que a observada por ESTEBAN et al. (1991) que foi de 53%, mas pode ser explicada devido à ausência de triagem prévia feita através deste marcador nos Bancos de Sangue da Espanha, contrariamente à França que realiza esta dosagem desde 1988, em todos os doadores.

Todos os doadores com teste anti-HBc positivo estiveram entre os casos ELISA2 positivos.

4.2 FATORES DE RISCO PARA VHC

Neste estudo, foram pesquisados os fatores com forte associação à contaminação pelo VHC, segundo a literatura.

Conforme é descrito por vários autores, a toxicomania está incontestavelmente relacionada com a transmissão da hepatite por vírus C (ALTER M.J., 1991; KALDOR et al. 1992; PATTI et al., 1993). Neste estudo a toxicomania foi o único fator encontrado somente entre os casos com testes ELISA2/RIBA2/PCR VHC positivos, não tendo sido observada na população controle. GUADAGNINO (1992) observou uma seroprevalência alta de anticorpos (63,4%) entre toxicômanos quando comparados à população controle (1,8%). A toxicomania, apesar de constituir um fator de exclusão para doação de sanguínea, foi encontrada neste trabalho. Enfatiza-se, portanto, a importância de um direto

questionamento a todo doador quanto à história de toxicomania endovenosa na entrevista do candidato a doação sanguínea, por estar este fator de risco certamente relacionado com a transmissão da hepatite por vírus C.

Os demais fatores de risco estiveram sempre presentes entre os doadores com testes positivos para o VHC, embora somente tatuagem tenha sido encontrada com diferença estatisticamente significativa da população controle, entre os doadores ELISA2/RIBA2/PCR VHC positivos, e tatuagem e transfusão sanguínea entre os ELISA2/RIBA2 positivos. A tatuagem constituiu o segundo fator de risco mais importante também no estudo de KALDOR et al.(1992).

Transfusão sanguínea apesar de ser uma forma de transmissão do VHC, bem documentada, não esteve presente de forma significativa entre os doadores com teste PCR VHC positivos.

Os demais fatores de risco analisados, profissão de saúde e acupuntura, apesar de terem sido sempre encontrados entre os casos com testes positivos para o VHC, não estiveram em um número significativamente maior do que na população controle.

Observou-se que 26 (45,6%) dos doadores ELISA2 positivos não apresentaram nenhum dos cinco fatores de risco pesquisados, fato este que vem de encontro com a existência de casos com transmissão mal definida ou transmissão esporádica, podendo-se aventar possibilidade de contaminação sexual, ou transmissão familiar e ou até mesmo transmissão materno-fetal.

É certo que com o isolamento do vírus da hepatite C e com o desenvolvimento de testes diagnósticos conseguiu-se re-

duzir a possibilidade de transmissão deste vírus através da transfusão sanguínea; tendo este controle melhorado ainda mais através dos testes de segunda geração. Assim mesmo, os testes de triagem, ELISA2, ainda apresentam problemas de especificidade, justificando a realização de outro exame, um teste confirmatório, que poderá, caso positivo, indicar presença de viremia ou infecciosidade. Mas se resultar indeterminado, poderá ter difícil interpretação e acarretar a necessidade de um terceiro teste, através da PCR VHC, para obter-se uma definição quanto à presença de viremia. Alguns casos com resultados conflitantes aos testes citados poderão possivelmente ter uma melhor definição através de reavaliações sequenciais, evolutivas.

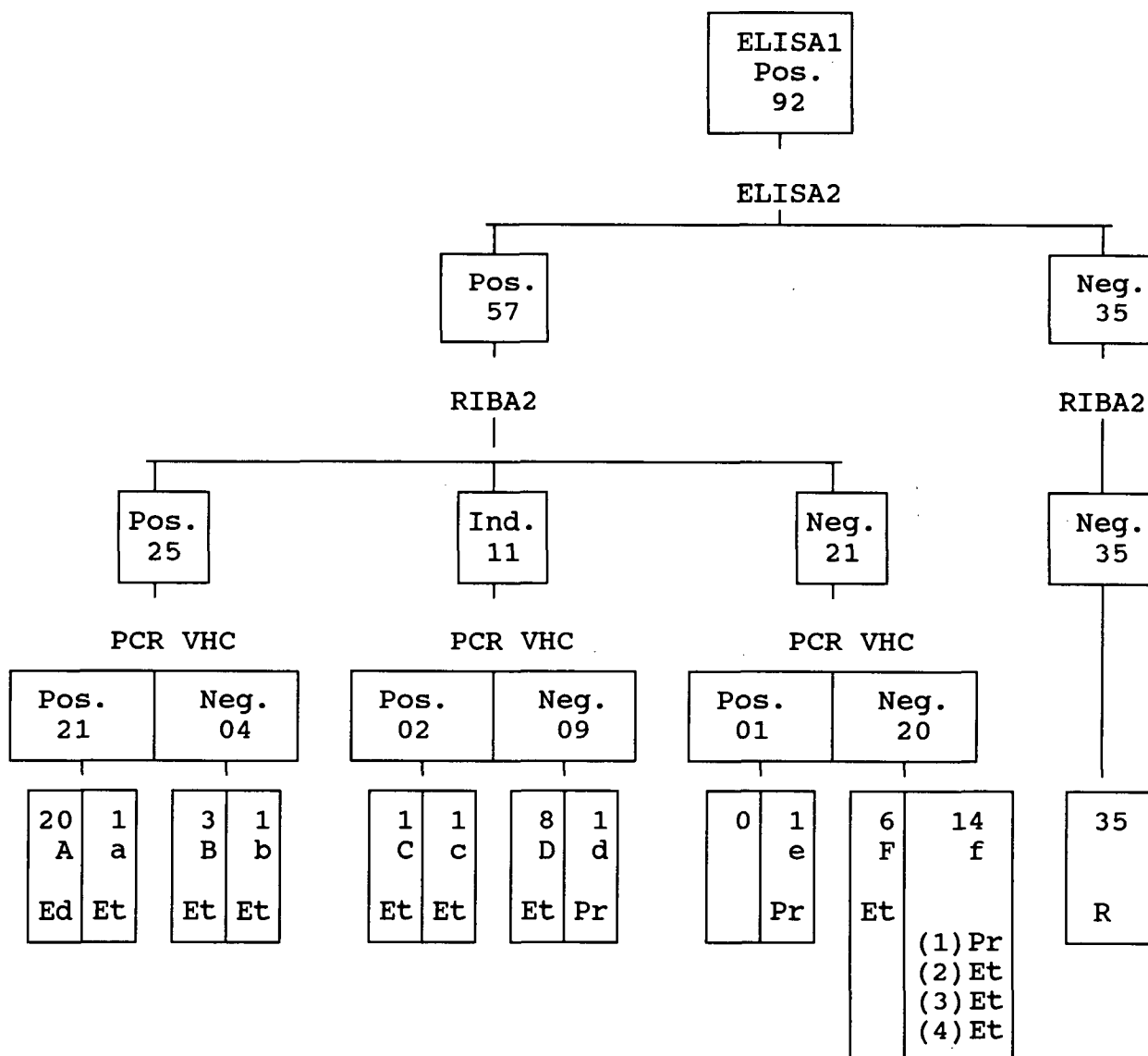
CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

- 1) Submetendo-se os casos ELISA1 positivos a uma comparação com outros três testes diagnósticos, observou-se um grande número de casos falso positivos ao teste de primeira geração, pois não houve a manutenção dos resultados em 38,0% no teste ELISA2, 72,8% no teste RIBA2 e 57,9% na PCR VHC.
- 2) O teste ELISA2 mostrou especificidade de 52,2% em relação ao teste RIBA2 para esta população em estudo. Encontrou-se relação entre a elevação do "índice de positividade" do teste ELISA2 com a positividade do teste RIBA2 e da PCR VHC.
- 3) O teste RIBA2 mostrou especificidade de 87,8% em relação à PCR VHC para esta população em estudo, confirmando a associação entre o teste RIBA2 positivo com a presença de infecciosidade.

Os doadores RIBA2 indeterminados tendo apresentado sempre a presença isolada do anticorpo C100-3, e em 81,8% teste PCR VHC negativo, não demonstraram relação com presença de viremia VHC.

- 4) Na reavaliação laboratorial realizada cerca de um ano após, 52% dos resultados puderam ser precisados. Confirmou-se a positividade de 94% dos casos ELISA2/RIBA2/PCR VHC e a negatividade de 47% dos casos ELISA2 positivos mas RIBA2/PCR VHC negativos. A continuidade na análise da evolução sorológica poderia auxiliar a definir os outros resultados, bem como contribuir no melhor conhecimento do comportamento viral.
- 5) Entre os doadores ELISA2/RIBA2/PCR VHC positivos, observou-se um número significativo, em relação à população controle, de casos com presença de ALT elevada, anticorpo HBc, história de toxicomania e de tatuagem.
- 6) Através dos resultados deste estudo, a conduta a ser sugerida para esta população estaria resumida no esquema a seguir:



Obs.: Letras em maiúscula referem-se aos doadores não reavaliados pela segunda vez e àqueles que ao serem reavaliados não alteraram o resultado dos três exames.

Letras em minúscula referem-se aos doadores com alterações nos resultados dos exames por ocasião da segunda avaliação.

CONDUTA FRENTE AO DOADOR:

R = Reencaminhamento para doação

Pr = Possível reencaminhamento para doação após nova dosagem perfil VHC.

Et = Exclusão temporária de doação:
(reavaliação sorológica periódica, incluindo dosagem de transaminases)

Ed = Exclusão definitiva de doação
(acompanhamento por especialista)

ANEXOS

ANEXO 1

FLUXOGRAMA DE RESULTADOS

Banco de sangue:

105.888 Doadores

ELISA 1

Pos.	Neg.
n=405	n=105.483

Convocados:

n=202

População em estudo:

n=92

ELISA 2

1ª avaliação:

Neg.	Pos.
n=35	n=57

#

RIBA 2

Pos.	Ind.	Neg.
n=25	n=11	n=21

PCR

Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.
n=21	n=04	n=02	n=09	n=01	n=20

2ª avaliação:

Comparecimento:

n=17	n=03	n=02	n=06	n=01	n=17
------	------	------	------	------	------

Mesmo resultado:

n=16	n=02	n=01	n=05	n=00	n=03
------	------	------	------	------	------

Alteração do resultado:

n=01	n=01	n=01	n=01	n=01	n=14
------	------	------	------	------	------

Tipo de alteração:

a	b	c	d	e	f
---	---	---	---	---	---

a - PCR Neg.

b - RIBA2 Ind.

c - RIBA2 Pos./PCR Neg.

d - ELISA2 Neg./RIBA2 Neg.

e - ELISA2 Neg./PCR Neg.

f - (1) 8 ELISA2 Neg; (2) 4 RIBA2 Ind; (3) 1 ELISA2 Neg/RIBA2 Ind.; (4) 1 RIBA2 Pos.

RIBA2 negativo em todos os 35 doadores

ANEXO 2

RESULTADOS DOS TESTES ELISA2, RIBA2, PCR VHC E DA PESQUISA DE CINCO FATORES DE RISCO, ALÉM DA PRESENÇA DE ALT ELEVADA E DO ANTICORPO HBc

Nº	ELISA2	RIBA 2				PCR	FR					ALT HBc	
		DO/CO	C5-1-1	C100-3	C-33	C-22	Ts.	Ps.	Tt.	Ac.	Tx.	>n1	pos.
1.	4,5	+4	+4	+4	+4	Pos.	-	-	-	-	-	-	X
1.	4,5	+4	+4	+4	+4	Pos.						-	
2.	2,2	+1	-	+4	+4	Pos.	-	-	-	X	-	X*	-
2.	4,5	+1	-	+4	+4	Pos.						X	
3.	4,3	+1	+1	+3	+4	Pos.	-	-	-	-	-	-	-
3.	4,1	+2	+1	+3	+4	Pos.						-	
4.	4,5	-	-	+2	+4	Pos.	-	-	-	-	-	-	-
4.	4,5	+1	+1	+3	+4	Neg.						-	
5.	4,5	+1	-	+4	+4	Pos.	-	-	-	X	-	-	-
6.	4,5	-	+1	+4	+4	Pos.	-	-	X	X	-	X	-
6.	4,5	-	+1	+4	+4	Pos.						-	
7.	4,5	+3	+3	+4	+4	Pos.	-	-	-	-	-	X	-
7.	4,5	+4	+4	+4	+4	Pos.						-	
8.	4,5	+1	+3	+4	+4	Pos.	X	-	X	-	-	-	-
9.	2,9	+3	+2	+2	+4	Pos.	-	X	X	-	-	X*	-
9.	4,5	+3	+2	+2	+4	Pos.						X	
10.	4,5	+4	+4	+4	+4	Pos.	-	-	-	-	-	X	-
11.	4,5	+2	+3	+4	+4	Pos.	-	-	-	X	-	X	-
11.	4,5	+1	+2	+4	+4	Pos.						X	
12.	3,5	+2	+2	-	-	Neg.	-	-	-	X	-	-	-
12.	2,6	+1	+3	-	-	Neg.						-	
13.	3,7	-	-	+3	+4	Pos.	-	-	-	X	-	X	-
13.	4,1	-	-	+3	+4	Pos.						-	
14.	3,9	-	+1	+3	+4	Pos.	X	-	-	-	-	X	-
14.	4,5	+2	+2	+4	+4	Pos.						-	
15.	4,4	+4	+4	+3	+4	Pos.	-	-	-	X	-	-	X
15.	4,5	+4	+4	+4	+4	Pos.						-	
16.	4,5	+3	+1	+4	+4	Pos.	-	X	-	-	-	X	-
16.	4,5	+4	+2	+4	+4	Pos.						-	

RESULTADOS DOS TESTES ELISA2, RIBA2, PCR VHC E DA PESQUISA DE CINCO FATORES DE RISCO, ALÉM DA PRESENÇA DE ALT ELEVADA E DO ANTICORPO HBc (continuação)

Nº	ELISA2		RIBA 2				PCR	FR					ALT HBc	
	DO/CO	C5-1-1	C100-3	C-33	C-22	Ts.		Ps.	Tt.	Ac.	Tx.	>n1	pos.	
17.	4,2	+3	+3	+2	+4	Pos.	-	-	-	-	-	X	-	
17.	4,3	+4	+4	+4	+4	Pos.						X		
18.	4,5	+4	+4	+4	+4	Pos.	-	-	-	-	-	X*	X	
18.	4,5	+4	+4	+4	+4	Pos.						X		
19.	4,5	+3	+1	+4	+4	Pos.	-	-	-	-	-	-	-	
19.	4,5	+3	+2	+4	+4	Pos.						-		
20.	2,9	+2	-	+4	+4	Pos.	-	-	-	X	-	X	-	
21.	2,9	+1	+2	+4	+4	Pos.	X	X	-	X	-	-	X	
21.	4,5	+3	+3	+4	+4	Pos.						-		
22.	4,3	+1	+1	-	-	Neg.	X	-	-	-	-	-	-	
22.	2,3	+2	+2	-	-	Neg.						-		
23.	4,5	+3	+3	+4	+4	Pos.	-	-	-	-	-	X	-	
23.	4,5	+3	+3	+3	+4	Pos.						-		
24.	4,5	+4	+3	+4	+4	Neg.	-	-	X	-	-	-	-	
25.	4,5	+4	+3	-	-	Neg.	-	-	-	-	-	-	-	
25.	4,5	+3	-	-	-	Neg.						-		
26.	2,6	-	-	-	-	Neg.	-	-	-	-	-	-	-	
26.	3,1	-	+1	-	-							-		
27.	1,2	-	-	-	-	Pos.	-	-	-	-	-	-	-	
27.	<1	-	+1	-	-	Pos.						-		
28.	2,2	-	-	-	-	Neg.	-	-	-	X	-	-	-	
28.	<1	-	-	-	-	Neg.						-		
29.	1,4	-	-	-	-	Neg.	-	-	-	-	-	-	-	
29.	2,5	-	+1	-	-	Neg.						-		
30.	1,0	-	-	-	-	Pos.	-	-	-	X	-	-	X	
30.	<1	-	-	-	-	Neg.						-		
31.	1,4	-	-	-	-	Neg.	-	-	-	X	-	-	-	
31.	<1	-	-	-	-	Neg.						-		

RESULTADOS DOS TESTES ELISA2, RIBA2, PCR VHC E DA PESQUISA DE CINCO FATORES DE RISCO, ALÉM DA PRESENÇA DE ALT ELEVADA E DO ANTICORPO HBc (continuação)

Nº	ELISA2	RIBA 2				PCR	FR					ALT HBc	
		DO/CO	C5-1-1	C100-3	C-33	C-22	Ts.	Ps.	Tt.	Ac.	Tx.	>nl	pos.
32.	1,0	-	-	-	-	Neg.	-	-	-	X	-	-	-
32.	<1	-	-	-	-	Neg.	-	-	-	-	-	-	-
33.	1,3	-	+1	-	-	Pos.	-	-	-	-	-	-	-
33.	1,9	-	+1	-	-	Pos.	-	-	-	-	-	-	-
34.	1,3	-	-	-	-	Neg.	-	-	-	-	-	-	-
34.	<1	-	-	-	-	Neg.	-	-	-	-	-	-	-
35.	1,3	-	-	-	-	Neg.	-	-	-	-	-	-	-
35.	<1	-	-	-	-	Neg.	-	-	-	-	-	-	-
36.	1,3	-	-	-	-	Neg.	X	-	-	-	-	-	-
37.	1,9	-	-	-	-	Neg.	-	-	-	X	-	-	-
38.	4,1	-	-	-	-	Neg.	-	-	-	-	-	-	-
38.	3,1	-	+2	-	-	Neg.	-	-	-	-	-	-	-
39.	1,7	-	-	-	-	Neg.	-	-	-	X	-	-	X
39.	1,2	+1	+1	-	-	Neg.	-	-	-	-	-	-	-
40.	1,4	-	-	-	-	Neg.	-	-	-	X	-	-	-
41.	1,2	-	-	-	-	Neg.	-	-	-	-	-	-	-
41.	2,1	-	-	-	-	Neg.	-	-	-	-	-	-	-
42.	2,9	-	-	-	-	Neg.	-	-	-	-	-	-	-
42.	<1	-	-	-	-	Neg.	-	-	-	-	-	-	-
43.	1,4	-	-	-	-	Neg.	-	-	-	-	-	-	-
43.	<1	-	-	-	-	Neg.	-	-	-	-	-	-	-
44.	3,8	-	-	-	-	Neg.	-	-	-	-	-	-	-
44.	1,9	-	+3	-	-	Neg.	-	-	-	-	-	-	-
45.	3,8	-	-	-	-	Neg.	-	-	-	X	-	-	-
45.	1,0	-	-	-	-	Neg.	-	-	-	-	-	-	-
46.	1,3	-	-	-	-	Neg.	X	X	-	-	-	-	-
46.	<1	-	-	-	-	Neg.	-	-	-	-	-	-	-

RESULTADOS DOS TESTES ELISA2, RIBA2, PCR VHC E DA PESQUISA DE CINCO FATORES DE RISCO, ALÉM DA PRESENÇA DE ALT ELEVADA E DO ANTICORPO HBc (continuação)

Nº	ELISA2	RIBA 2				PCR	FR					ALT HBc	
		DO/CO	C5-1-1	C100-3	C-33	C-22	Ts.	Ps.	Tt.	Ac.	Tx.	>n1	pos.
47.	1,6	-	-	-	-	Neg.	-	X	-	-	-	-	-
47.	1,1	-	-	-	-	Neg.	-						
48.	1,8	-	+2	-	-	Neg.	-	-	-	-	-	-	-
49.	1,8	-	+1	-	-	Neg.	-	-	-	-	-	-	-
49.	2,0	-	+2	-	-	Neg.	-						
50.	4,5	-	+1	-	-	Pos.	-	-	-	-	-	-	-
50.	4,5	+1	+2	-	-	Neg.	-						
51.	4,5	-	+2	-	-	Neg.	-	-	-	-	-	X	-
52.	2,7	-	+1	-	-	Neg.	-	-	-	-	-	-	-
52.	1,1	-	+2	-	-	Neg.	-						
53.	4,5	-	+3	-	-	Neg.	-	-	-	-	-	-	-
53.	2,0	-	+4	-	-	Neg.	-						
54.	2,8	-	+1	-	-	Neg.	X	-	-	-	-	-	-
54.	1,9	-	+1	-	-	Neg.	-						
55.	2,8	-	+2	-	-	Neg.	-	-	-	-	-	-	-
55.	1,0	-	+1	-	-	Neg.	-						
56.	2,0	-	+1	-	-	Neg.	-	-	-	X	-	-	-
56.	<1	-	-	-	-	Neg.	-						
57.	3,3	-	+1	-	-	Neg.	-	-	-	-	-	-	-

Ts. = Transfusão sanguínea

Ps. = Profissional de saúde

Tt. = Tatuagem

Tx. = Toxicomania

Ac. = Acupuntura

* Corresponde a três elevações de transaminases

ANEXO 3

PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO

Nome: _____ Sexo: _____

Data de nascimento: _____

a) Fatores de risco:

	Sim	Não	Dúvida
1 Transfusão	()	()	()
2 Profissional de saúde	()	()	()
3 Tatuagem	()	()	()
4 Acupuntura	()	()	()
5 Toxicomania	()	()	()

b) Quadro clínico:

1 astenia	()	()
2 anorexia	()	()
3 náuseas e vômitos	()	()
4 icterícia	()	()
5 uso de medicamento	()	()

tipo: _____

6 abuso do álcool	()	()
7 telangiectasias	()	()
8 aranhas vasculares	()	()
9 eritema palmar	()	()
10 hepatomegalia	()	()
11 esplenomegalia	()	()

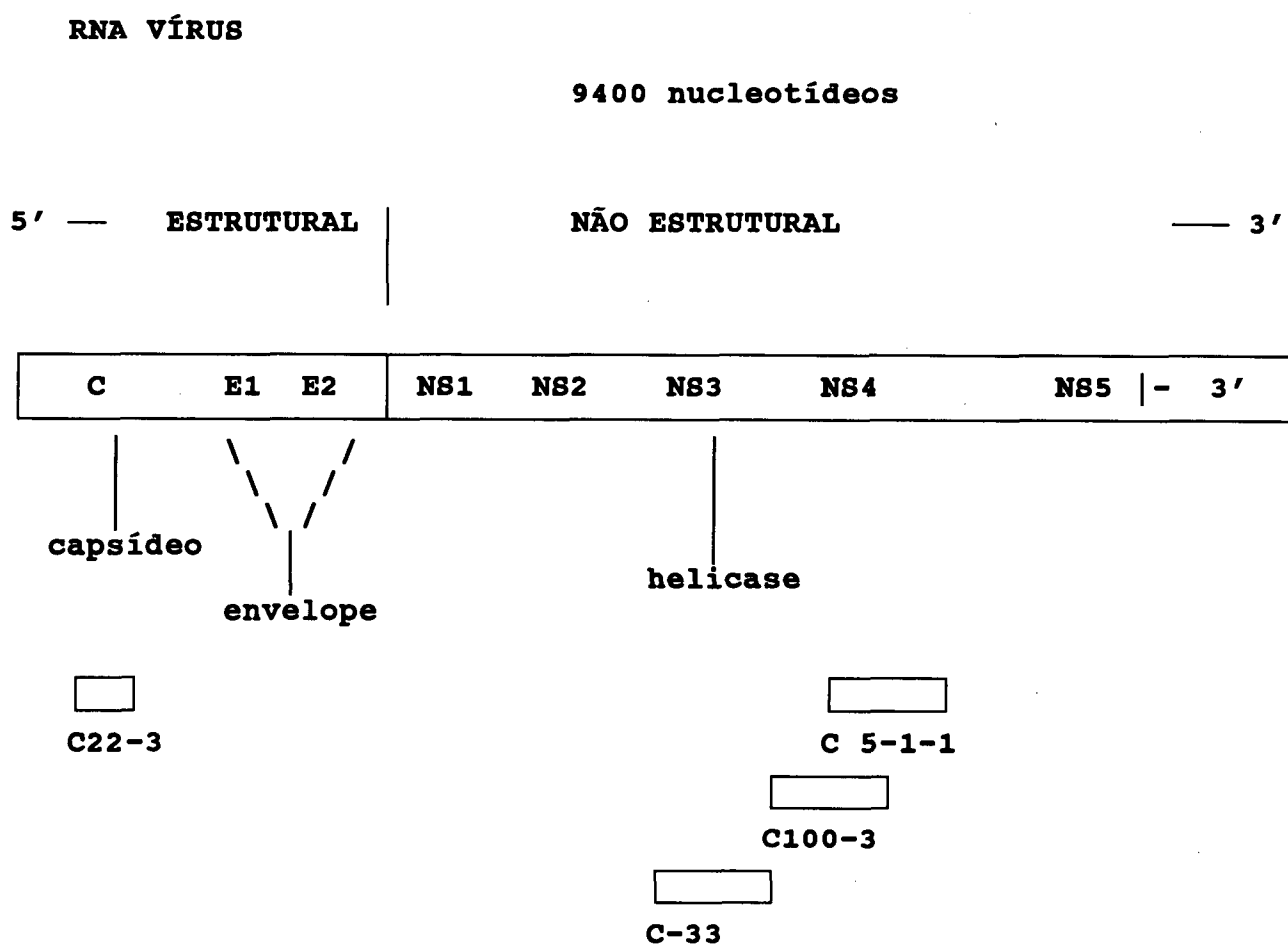
12 outros _____

c) Exames laboratoriais:

	1a. avaliação	2a. avaliação
1 Anti-VHC ELISA de segunda geração:		
2 Anti-VHC RIBA de segunda geração:		
3 PCR VHC:		
4 ALT:		
5 Anti-HBc:		

ANEXO 4

FIGURA 1 - CARACTERÍSTICAS DA ESTRUTURA GENÉTICA DO VHC E ANTÍGENOS CORRESPONDENTES



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 AACH, R. D.; STEVENS, C. E.; HOLLINGER, F. B. et al. Hepatitis C virus infection in post-transfusion hepatitis. An analysis with first and second-generation assay. *N. Engl. J. Med.*, Boston, v. 325, p. 1325-1328, 1991.
- 2 ABE, K.; INCHAUSPE, G. Transmission of hepatitis C by saliva. *Lancet*, London, v. 337, p. 248, 1991.
- 3 ACETI, A.; TALIANI, G.; DE BAC, C et al. Anti-HCV false positivity in malaria. *Lancet*, London, v. 336, p. 1442-1443, 1990.
- 4 AGUELLES, D.; JANOT, C. Epidemiology of anti-HCV antibodies in France. Viral hepatitis study group of the french blood transfusion society. *Arch. Virol. Suppl.*, Vienna, v. 4, p. 249-252, 1992.
- 5 ALBERTI, A.; CHEMELLO, L.; CAVALETTI, D. Antibody to hepatitis C virus and liver disease in volunteer blood donors. *Ann. Intern. Med.*, Philadelphia, v. 114, p. 1010-1012, 1991.
- 6 ALBERTI, A. Diagnosis of hepatitis C: facts and perspectives. *J. Hepatol.*, Amsterdam, v. 12, p. 279-282, 1991b.
- 7 ———; MORSICA, G.; CHEMELLO, L. et al. Hepatitis C viraemia and liver disease in symptom-free individuals with anti-HCV. *Lancet*, London, v. 340, p. 697-698, Sept. 1992.
- 8 ALLAIN, J. P.; RANKIN, A.; KUHNS, M. C. et al. Clinical importance of HCV confirmatory testing in blood donors. *Lancet*, London, v. 339, p. 1171-1172, May 1992.
- 9 ALONSO, C.; PEDROSO, M. L.; SANJOSÉ, S; MONTCHARMONT, P; CHEVRE, J.M.; BOUCAUD, M.J.; LAMBERT, V; CORTEY, M.L.; TREPO, C. Hepatitis C virus among blood donors: follow-up study. *Transfusion*, Philadelphia, 1993. in press.
- 10 ALTER, H. J.; PURCELL, R. H.; SHIH, J. W. et al. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non A non B hepatitis. *N. Engl. J. Med.*, Boston, v. 321, p. 1494-1500, 1989a.

- 11 ALTER, H. J.; PURCELL, R. H.; HOLLAND, P. V. et al. Clinical and serological analysis of transfusion associated hepatitis. **Lancet**, London, v. 2, p. 838-841, 1975a.
- 12 ALTER, H. J.; PURCELL, R. H.; HOLLAND, P. V. et al. Donor transaminase and recipient hepatitis. Impact on blood transfusion services. **JAMA**, Chicago, v. 246, p. 630-634, 1981.
- 13 ALTER, H. J.; PURCELL, R. H.; HOLLAND, P. V. The emerging pattern of posttransfusion hepatitis. **Am. J. Med. Sci.**, Thorofar NJ, v. 270, p. 329-334, 1975b.
- 14 ALTER, H. J.; PURCELL, R. H.; HOLLAND, P. V.; POPPER, H. Transmissible agent in non-A, nonB hepatitis. **Lancet**, London, v. 1, p. 459-463, 1978.
- 15 ALTER, H. J. Discovery of the non-A non-B hepatitis virus: the end of the beginning or the beginning of the end. **Trans. Med. Rev.**, v. III, n. 2, p. 77-81, 1989b
- 16 ALTER, H. J. New kit on the block: evaluation of second-generation assays for detection of antibody to the hepatitis C virus. **Hepatology**, Baltimore, v. 15, n. 2, 1992.
- 17 ALTER, M. J. Inapparent transmission of hepatitis C: footprints in the sand. **Hepatology**, Baltimore, v. 14, p. 389-391, 1991.
- 18 ALTER, M. J.; COLEMAN, P. J.; ALEXANDER, W. J. et al. Importance of heterosexual activity in the transmission of hepatitis B and non A non B hepatitis. **JAMA**, Chicago, v. 262, p. 1202-1205, 1989.
- 19 BARBARA, J. A. J.; CONTRERAS, M. Non A, non B hepatitis and the anti-HCV assay. **Vox Sang.**, Basel, v. 60, p. 1-7, 1991.
- 20 BIZZARO, N.; TREMOLADA, F.; CASARIN, C. et al. Serum alanine aminotransferase levels among volunteer blood donors: effect of sex, alcohol intake and obesity. **Ital. J. Gastroenterol.**, Roma, v. 24, p. 237-241, 1992.
- 21 BORTOLOTTI, F.; TAGGER, A.; CADROBBI, P. et al. Antibodies to hepatitis C virus in community-acquired acute non A, non B hepatitis. **J. Hepatol.**, Amsterdam, v. 12, p. 176-180, 1991.
- 22 BOUDART, D; LUCAS, J. L.; MULLER, J. Y. et al. False-positive hepatitis C virus antibody tests in paraproteinaemia. **Lancet**, London, v. 336, p. 63, 1990.

- 23 BOUDART, D.; LUCAS, J. C.; ADJOU, C. et al. HCV confirmatory testing of blood donors. **Lancet**, London, v. 339, p. 372, 1992.
- 24 BRACKMANN, S. A.; GERRITZEN, A.; OLDENBURG, J. et al. Search for intrafamilial transmission of hepatitis C virus in hemophilia patients. **Blood**, New York, v. 81, n. 4, p. 1077-1082, Feb. 1993.
- 25 BRADLEY, D. W. Virology, molecular biology and serology of hepatitis C virus. **Trans. Med. Rev.**, v. 2, p. 93-102, 1992.
- 26 BRADLEY, D. W.; MAYNARD, J. E. Etiology and natural history of post-transfusion and enterically-transmitted non A, non B hepatitis. **Sem. Liver Dis.**, New York, v. 6, p. 56-66, 1986.
- 27 BRADLEY, D. W.; McCAUSTLAND, K. A.; COOK, E. H. et al. Posttransfusion non A non B hepatitis in chimpanzees: physicochemical evidence that the tubule-forming agent is a small, enveloped virus. **Gastroenterology**, New York, v. 88, p. 773-779, 1985.
- 28 BRADLEY, D. W. The agents of non A non B hepatitis. **J. Virol. Methods**, Amsterdam, v. 10, p. 307-319, 1985.
- 29 BRECHOT, C. Le virus de l'hépatite C: une découverte de la biologie moléculaire. **Gastroenterol. Clin. Biol.**, Paris, v. 14, p. 54-55, 1990.
- 30 BRILLANTI, S.; MASCI, C.; RICCI, P. et al. Significance of IgM antibody to hepatitis C virus in patients with chronic hepatitis C. **Hepatology**, Baltimore, v. 15 p. 998-1001, 1992.
- 31 BROUAYE, N.; VALLA, D.; CADRANEL, J. F. et al. Modèle mathématique de la transmission transfusionnelle de l'hépatite non A non B. Estimation de la prévalence et du portage chronique infectieux chez les donneurs de sang. **Gastroenterol. Clin. Biol.**, Paris, v. 14, p. A207, 1990. Resumo.
- 32 BRUCE, M. L. A.; FOGAÇA, H. S.; VALENÇA, J. E.; APPOLINÁRIO J. C. B. Hepatite não A não B levantamento bibliográfico do últimos dez anos. **Ac. Gastro.**, p. 28-35, set./out. 1985.
- 33 BRUIX, J.; CALVET, X.; COSTA, J. et al. Prevalence of antibodies to hepatitis C virus in Spanish patients with hepatocellular carcinoma and hepatic cirrhosis. **Lancet**, London, v. 2, p. 1004-1006, 1989

- 34 BUSCH, M. P.; TOBLER, L.; QUAN, S. et al. A pattern of 5-1-1 and C100-3 only on hepatitis C virus (HCV) recombinant immunoblot assay does not reflect HCV infection in blood donors. **Transfusion**, Philadelphia, v. 33, n. 1, p. 84-88, Jan. 1993.
- 35 CACOPARDO, B.; FATUZZO, F; COSENTINO, S. et al. **Arch. Virol. Suppl.**, Vienna, v. 4, p. 333-34, 1992.
- 36 CARDOSO, M. S.; JOCHEM, H.; HESSE, R. et al. Evaluating recombinant protein immunoblot assay and polymerase chain reaction for diagnosis of non-A non-B hepatitis. **JID**, v. 166, p. 450-451, Aug. 1992.
- 37 CARIANI, E.; ZONARO, A.; PRIMI, D. et al. Detection of HCV RNA and antibodies to HCV after needlestick injury. **Lancet**, London, v. 337, p. 850, 1991.
- 38 CASPARI, G.; GERLICH, W. H.; BEYER, J. et al. Variable results of first-generation anti-HCV enzyme immunoassay during follow-up of blood donors. **Vox Sang.**, Basel, v. 64, p. 61-62, 1993.
- 39 CAUSE, X.; GODINOT, H.; CHEVALIER, M. et al. Comparison of 1 or 3 MU of interferon alpha-2b and placebo in patients with chronic non A non B hepatitis. **Gastroenterology**, New York, v. 101, p. 497-502, 1991.
- 40 CHAUDHARY, R. K.; FRENETTE, S.; MO, T. Evaluation of hepatitis C virus kits. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 29, p. 2616-2617, 1991.
- 41 CHAN, S. W.; SIMMONDS, P.; MCNISH et al. Serological responses to infection with three different types of hepatitis C virus. **Lancet**, London, v. 338, p. 1391, 1991.
- 42 CHIEN, D. Y.; FABRIZI, A; MCFARLAND et al. Distinct subtypes of hepatitis C virus defined by antibodies directed to the putative core, NS-4 and NS-5 region polypeptides. In : INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON VIRAL HEPATITIS AND LIVER DISEASE (1993 : Tokyo). **Abstract...** Tokyo, 1993.
- 43 CHOO, Q. L.; KUO, G.; WEINER, A. J. et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non A non B viral hepatitis genome. **Science**, Washington, v. 244, p. 359-361, 1989.
- 44 CHOO, Q. L.; WEINER, A. J.; OVERBY, L. R. et al. Hepatitis C virus the major causative agent of viral non A non B hepatitis. **Br. Med. Bull.**, London, v. 46, p. 423-441, 1990.

- 45 CHOO, Q. L.; RICHMAN, K. H.; HAN, J. H. et al. Genetic organisation and diversity of the hepatitis C virus. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v. 88, p. 2451-2455, 1991.
- 46 CHOU, W.H.; YONEYAMA, T.; TAKEUCHI, K.; et al.. Discrimination of hepatitis C virus in liver tissues from different patients with hepatocellular carcinomas by direct nucleotide sequencing of amplified cDNA of the viral genome. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 29, p. 2860-2864, 1991.
- 47 CLAEYS, H.; VOLKAERTS, A.; VERHAERT, H. et al. Evaluation of anti-HCV capsid indeterminate serum samples. **Lancet**, London, v. 340, p. 249, 1992.
- 48 CLEMENS, J. M.; TASKAR, S.; CHAU, K. et al. IgM antibody response in acute hepatitis C viral infection. **Blood**, New York, v. 79, p. 169-172, Jan. 1992.
- 49 COLLET, M. S.; ANDERSON, D. K.; RETZEL, E. Comparisons of the pestivirus bovine viral diarrhea virus with members of the flaviviridae. **J. Gen. Virol.**, London, v. 69, p. 2637-2643, 1988.
- 50 COLOMBO, M.; CHOO, Q. L.; DEL NINNO, E. et al. Prevalence of antibodies to hepatitis virus in Italian patients with hepatocellular carcinoma and hepatic cirrhosis. **Lancet**, London, v. 2, p. 1006-1008, 1989.
- 51 CONSTANTINE, N. T.; ZHANG, X.; LEE, L. et al. Detection of antibodies to hepatitis C virus in urine. **Lancet**, London, v. 339, p. 1607-1608, June 1992. Letter.
- 52 CONTRERAS, M.; ANDERSON, C. C.; BARBARA, J. A. et al. Low incidence of non A non B post-transfusion hepatitis in London confirmed by hepatitis C virus serology. **Lancet**, London, v. 337, p. 753-757, 1991.
- 53 COUROUCÉ, A. M.; JANOT, C.; HEPATITIS STUDY GROUP OF THE FRENCH SOCIETY OF BLOOD TRANSFUSION. Recombinant immunoblot assay first and second generation on 732 blood donors reactive for antibodies to hepatitis C virus by ELISA. **Vox Sang.**, Basel, v. 61, p. 177-180, 1991.
- 54 CRAXI, A.; FIORENTINO, G.; DI MARCO, V. et al. Second generation tests in diagnosis of chronic hepatitis C. **Lancet**, London, v. 337, p. 1354, 1991.
- 55 CRISTIANO, K.; DI BISCEGLIE, A. M.; HOOFNAGLE, J. H. et al. Hepatitis C viral RNA in serum of patients with chronic non A non B hepatitis: detection by the polymerase chain reaction using multiple primer sets. **Hepatology**, Baltimore, v. 14, p. 51-55, 1991.

- 56 CZAJA, A. J.; TASWELL, H. F.; RAKELA, J. et al. Duration and specificity of antibodies to hepatitis C virus in chronic active hepatitis. **Gastroenterology**, New York, v. 102, p.1675-1679, 1992.
- 57 DAVIS, G.; BALART, L.; SCHIFF, E. et al. Treatment of chronic hepatitis C with recombinant interferon alpha. A multicenter randomized, controlled trial. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 321, p. 1501-1506, 1989.
- 58 DAZZA, M. C.; MENESES, L. V.; GIRARD, P. M. et al. Hepatitis C virus antibody and hepatocellular carcinoma. **Lancet**, London, v. 335, p. 1216, 1990.
- 59 DE BEENHOUWER, H; VERHAERT, H; CLAEYS, H. et al. Confirmation of hepatitis C virus positive blood donors by immunoblotting and polymerase chain reaction. **Vox Sang.**, Basel, v. 63, n. 3, p. 198-203, 1992.
- 60 DEGOS, F.; THIERS, V.; ERLINGER, S. Neonatal transmission of HCV from mother with chronic hepatitis. **Lancet**, London, v. 338, p. 758, 1991.
- 61 DI BISCEGLIE, A.; MARTIN, P.; KASSIANIDES, C. et al. Recombinant interferon alpha therapy for chronic hepatitis C. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 321, p. 1506-1510, 1989.
- 62 DIENSTAG, J. L.; ALTER, H. J. Non A, non B hepatitis: evolving epidemiologic and clinical perspective. **Semin. Liver. Dis.**, New York, v. 6, p. 67-81, 1986.
- 63 DIENSTAG, J. L. Non A non B hepatitis: experimental transmission, putative virus agents and markers and prevention. **Gastroenterology**, New York, v. 85, p. 743-768, 1983.
- 64 _____. Hepatitis non A, non B: at last. **Gastroenterology**, New York, v. 99, p. 1177-1180, 1990.
- 65 _____. Non A non B hepatitis: recognition, epidemiology, and clinical features. **Gastroenterology**, New York, v. 85, p. 439-462, 1993b.
- 66 DIODATI, G.; TAGGER, A.; BONETTI, P. et al. Antibody to hepatitis C virus in cryptogenic chronic liver disease. **J. Med. Virol.**, New York, v. 35, p. 151-154, 1991.
- 67 DOOD, R. Y. Hepatitis C virus, antibodies, and infectivity, paradox, pragmatism, and policy. **Am. J. Clin. Pathol.**, Philadelphia, v. 97, n. 1, p. 4-5, 1991.
- 68 DUSHEIKO, G. M.; SMITH, M.; SCHEUER, P. J. Hepatitis C virus transmitted by human bite. **Lancet**, London, v. 336, p. 503-504, 1990.

- 69 EBELING, F.; NAUKKARINEN, R.; MYLLYLÄ, G. et al. Second-generation RIBA to confirm diagnosis of HCV infection. *Lancet*, London, v. 337, p. 912, Apr. 1991.
- 70 ELLIS, L. A.; BROWN, D.; CONRADIE, J. D. et al. Prevalence of hepatitis in South Africa: detection of anti-HCV in recent and stored serum. *J. Med. Virol.*, New York, v. 32, p. 249-251, 1990.
- 71 ERLICH, H. A.; GELFAND, D.; SNINSKI, J. J. Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science*, Washington, v. 252, p. 1643-1651, 1991.
- 72 ESTEBAN, J. I.; VILADOMIU, L.; GONZALEZ, A. et al. Hepatitis C virus antibodies among risk groups in Spain. *Lancet*, London, v. 2, p. 294-297, 1989.
- 73 ESTEBAN, J. I.; GONZALEZ, A.; HERNANDEZ, J. M. et al. Evaluation of antibodies to hepatitis C virus in a study of transfusion-associated hepatitis. *N. Engl. J. Med.*, Boston, v. 323, p. 1107-1112, 1990.
- 74 ESTEBAN, J. I.; LOPEZ-TALAVERA, J. C.; GENESCA, J. et al. High rate of infectivity and liver disease in blood donors with antibodies to hepatitis C virus. *Ann. Intern. Med.*, Philadelphia, v. 115, p. 443-449, 1991.
- 75 EVERHART, J.; DI BISDEGLIE, M.; MURRAY, L. M.; et al. Risk for non A, non B (type C) hepatitis through sexual or household contacts with chronic carriers. *Ann. Intern. Med.*, Philadelphia, v. 112, p. 544-545, 1990.
- 76 FAGAN, E. Testing for hepatitis C virus. *BMJ*, London, v. 303, p. 535-536, Sep. 1991.
- 77 FARCI, P.; ALTER, H. J.; WONG, D. et al. A long-term study of hepatitis C virus replication in non A non B hepatitis. *N. Engl. J. Med.*, Boston, v. 325, p. 98-104, 1991.
- 78 FARCI, P.; LONDON, W. T.; WONG, D. The natural history of infection with hepatitis C virus (HCV) in chimpanzees: comparison of serologic responses measured with first-and-second generation assays and relationship to HCV viremia. *J. Infect. Dis.*, Chicago, v. 165, p. 1006-1011, 1992.
- 79 FEINMAN, S. V.; BERRIS, B.; HERST, R. Anti-HCV in post-transfusion hepatitis : deductions from a prospective study. *J. Hepatol.*, Amsterdam, v. 12, p. 337-381, 1991.
- 80 FLOREANI, A.; BERTIN, T.; SOFFIATI, G. et al. Anti-hepatitis C virus in the elderly: a seroepidemiological study in a home for the aged. *Gerontology*, Basel, v. 38, n. 4, p. 214-216, 1992.

- 81 FOLLET, E. A. C.; DOW, B. C.; MCOMISH, F. et al. HVC confirmatory testing of blood donors. **Lancet**, London, v. 338, p. 1024, 1991.
- 82 FRIEDLAENDER, M. M.; KASPA, R. T. Chronic hepatitis in kidney allograft recipients. **Lancet**, London, v. 335, p. 1465, 1990.
- 83 GARASSINI, M. A.; ORTEGA, F.; ALVARADO, M. et al. Antibodies against hepatitis C virus. Experience with a second generation test. **GEN**, Caracas, v. 45, n. 3, p. 183-189, 1991.
- 84 GARSON, J. A.; TEDDER, R. S.; BRIGGS, M. et al. Detection of hepatitis C viral sequences in blood donations by "nested" polymerase chain reaction and prediction of infectivity. **Lancet**, London, v. 335, p. 1419-1422, 1990a.
- 85 GARSON, J. A.; TUKE, P. W.; MAKRIS, M. et al. Demonstration of viraemia patterns in haemophiliacs treated with hepatitis C-virus contaminated factor VIII concentrates. **Lancet**, London, v. 336, p. 1022-1025, 1990b.
- 86 GARSON, J. A.; RING, C.; TUKE, P. et al. Enhanced detection by PCR of hepatitis C virus RNA. **Lancet**, London, v. 336, p. 878-879, 1990c.
- 87 GARSON, J. A.; CLEWLEY, J. P.; SIMMONDS, P. et al. Hepatitis C viraemia in United Kingdom blood donors. **Vox Sang.**, Basel, v. 62, p. 218-223, 1992.
- 88 GEIGER, C. P.; CASELMAN, W. H. Non-radioactive hybridization with hepatitis C virus-specific probes created during polymerase chain reaction: a fast and simple procedure to verify hepatitis C virus infection. **J. Hepatol.**, Amsterdam, v. 15, n. 3, p. 387-390, July 1992.
- 89 GERBER, M. Chronic hepatitis C: The beginning of the end of a time-honored nomenclature? **Hepatology**, Baltimore, p. 733-734, 1992.
- 90 GILBERTI, T.; FERRARI, C.; MARCHELLI, S. et al. Long-term follow-up of anti-hepatitis C virus antibodies in patients with acute nonA nonB hepatitis and different outcome of liver disease. **Liver**, Copenhagen, v. 12, p. 94-99.
- 91 GONÇALES JÚNIOR, F. L. **Estudo clínico-epidemiológico das hepatites pós-transfusionais**. Papel dos principais marcadores sorológicos envolvidos na transmissão. Campinas, 1991. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

- 92 GORDON, S. C.; PATEL, A. H.; KULESZA, G. N. et al. Lack of evidence for heterosexual transmission of hepatitis C. **Am. J. Gastroenterol.**, New York, v. 87, n. 12, p. 1849-1851, Dec. 1992.
- 93 HABIBI, B; SMILOVICI, W. Rapport sur la prevention des hépatites pot-transfusionnelles non-A non-B. **Rev. Fr. Transfus. Immunohematol.**, Paris, v. 31, n. 3, p. 537-587, 1988.
- 94 HAGIWARA, H.; HAYASHI, N.; MITA, E. et al. Detection of hepatitis C virus RNA in serum of patients with chronic hepatitis C treated with interferon alpha. **Hepatology**, Baltimore, v. 15, p. 37-41, 1992.
- 95 HAYASHI, J.; NAKASHIMA, K.; HIRATA, M et al. Hepatitis virus detection is facilitated by the combined use of C100 protein and GOR epitope. **Gastroenterol. Jpn.**, Tokyo, v. 27, n. 5, p. 632-637, Oct. 1992.
- 96 HOOFNAGLE, J.; MULLEN, K.; JONES, D. et al. Treatment of chronic non A non B hepatitis with recombinant human alpha interferon. A preliminary report. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 315, p. 1575-1578, 1986.
- 97 HOPF, U.; MOLLER, B.; KUTHER, D. et al. Long-term follow-up of posttransfusion and sporadic chronic hepatitis non A non B and frequency of circulating antibodies to hepatitis C virus (HCV). **J. Hepatol.**, Amsterdam, v. 10, p. 69-76, 1990.
- 98 HOSODA, K.; YOKOSUKA, O.; OMATA, M.; et al.. Detection and partial sequencing of hepatitis C virus RNA in the liver. **Gastroenterology**, New York, v. 101, p. 766-771, 1991.
- 99 HOUGHTON, M.; WEINER, A; HAN, J. et al. Molecular biology of the hepatitis C viruses: implications for diagnosis, development and control of viral disease. **Hepatology**, Baltimore, v. 14, n. 2, p. 381-387, 1991.
- 100 HOYOS, M; SARRION, J. V.; PEREZ, C. T. et al. Prospective assessment of donor blood screening for antibody to hepatitis B core antigen as a means of preventing posttransfusion non A non B hepatitis. **Hepatology**, Baltimore, v. 9, p. 449-451, 1989.
- 101 HSU, S. C.; CHANG, M. H.; CHEN, D. S. et al. Non A non B hepatitis in children: a clinical, histologic and serologic study. **J. Med. Virol.**, New York, v. 35, p. 1-6, 1991.
- 102 IDEQ, J.; BELLATI, G.; PEDRAGLIO, E. et al. Intrafamilial transmission of hepatitis C virus. **Lancet**, London, v. 335, p. 353, 1990.

- 103 IKEDA, Y.; TODA, G.; HASHIMOTO, N. et al. Antibody to superoxide dismutase, autoimmune hepatitis, and antibody tests for hepatitis C virus. **Lancet**, London, v. 335, p. 1345-1346, 1990.
- 104 ILARDI, I.; ERRERA, G.; DE SANCTIS, G. N. et al. Prevalence of anti-HCV in two Tanzanian villages. **Arch. Virol. Suppl.**, Vienna, v. 4, p. 347-348, 1992.
- 105 INABA, S.; FUKUDA, M.; OKOCHI, K. et al. HCV transmission after receiving anti-C100-negative blood units. **Lancet**, London, v. 337, p. 1354, June 1991.
- 106 IRVING, W. J.; DAY, S.; EGLIN, R. P. et al. Hepatitis C in blood donors. **Lancet**, London, v. 341, p.835-836, 1993.
- 107 ISHIGURO, N.; TOMIMATSU, M.; NAGAHARA, H. et al. Clinical evaluation of a newly established anti-HCV assay for the diagnosis of hepatitis C in Japan. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, Melbourne, v. 7, n. 56, p. 602-607, Nov./Dec. 1992.
- 108 JANOT, C.; COUROCÉ, A. M.; MAINEZ, M. Antibodies to hepatitis C virus in french blood donors. **Lancet**, London, v. 2, p. 796-797, 1989.
- 109 KALDOR, J. M.; ARCHER, G. T.; BURING, M. L. et al. Risk factors for hepatitis C virus infection in blood donors: a case control study. **Med. J. Aust.**, Sydney, v. 157, n.4, p. 227-230, Aug. 1992.
- 110 KANAI, K.; KAKO, M.; OKAMOTO, H. HCV genotypes in chronic hepatitis C and response to interferon. **Lancet**, London, v. 339, p. 1543, 1992. Letter.
- 111 KATO, N.; HUJIKATA, M.; OOTSUYAMA, V. et al. Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from japanese patients with non A non B hepatitis. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v. 87, p. 9524-9528, 1990.
- 112 KEW, M. C.; HOUGHTON, M.; CHOO, Q. L. et al. Hepatitis C virus antibodies in Southern African blacks with hepatocellular carcinoma. **Lancet**, London, v. 335, p. 873-874, 1990.
- 113 KHUROO, M. S. Study of an epidemic of non-A non-B hepatitis. Possibility of another human hepatitis virus distinct from post-transfusion non A non B type. **Am. J. Med.**, New York, v. 68, p. 818-824, 1980.
- 114 KIYOSAWA, K.; SODEYAMA, T.; TANAKA, E. et al. Hepatitis C in hospital employees with needlestick injuries. **Ann. Intern. Med.**, Philadelphia, v. 115, p. 367-369, 1991.

- 115 KIYOSAWA, K.; SODEYAMA, T.; TANAKA, E. et al. Intrafamilial transmission of hepatitis C virus in Japan. *J. Med. Virol.*, New York, v. 33, p. 114-116, 1991.
- 116 KIYOSAWA, K.; AKAHANEY, Y.; NAGATA, A.; et al.. Hepato-cellular carcinoma after non A non B post-transfusion hepatitis. *Am. J. Gastroenterol.*, New York, v.79, p. 777-781, 1984.
- 117 KO, Y. C.; HO, M. S.; CHIANG, T. A. et al. Tattooing as a risk of hepatitis virus infection. *J. Med. Virol.*, New York, v. 38, n. 4, p. 288-291, Dec. 1992.
- 118 KOMIYAMA, K.; MORO, I.; MASTUDA, Y. et al. HCV in saliva of chronic hepatitis patients having dental treatment. *Lancet*, London, v. 338, p. 572, 1991.
- 119 KUHNL, P.; SEIDL, S.; STANGEL, W. et al. Antibody to hepatitis C virus in German blood donors. *Lancet*, London, v. 2, p. 324, 1989. Letter.
- 120 KUO, G.; CHOO, Q. L.; ALTER, H. et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non A non B hepatitis. *Science*, Washington, v. 244, p. 362-364, 1989.
- 121 LAM, J. P.; McOMISH, F.; BURNS, S. M. et al. Infrequent vertical transmission of hepatitis C virus. *J. Infect. Dis.*, Chicago, v. 167, n. 3, p. 572-576, Mar. 1993.
- 122 LARSEN, J.; SKAUG, K.; MAELAND, A. Second generation anti-HCV tests predict infectivity. *Vox Sang.*, Basel, v. 63, n. 1, p. 39-42, 1992.
- 123 LAURENT, F.; LI, J. S.; VITVITSKI, L. et al. Intérêt de la PCR dans le diagnostic des hépatites C. *Rev. Fr. Transfus. Hémobiol.*, Paris, v. 35, p. 211-224, 1992.
- 124 LAZIZI, Y.; ELFASSI, E.; PILLOT, J. Detection of hepatitis C virus sequences in sera with controversial serology by nested polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v. 30, p. 931-934, 1992.
- 125 LEE, S. D.; CHAN, C. Y.; WANG, Y. J. et al. Seroepidemiology of hepatitis C virus infection in Taiwan. *Hepatology*, Baltimore, v. 13, p. 830-833, 1991a.
- 126 LEE, S. D.; HWANG, S. J.; LU, R. H. et al. Antibodies to hepatitis C virus in prospectively followed patients with posttransfusion hepatitis. *J. Infect. Dis.*, Chicago, v. 163, p. 1354-1357, 1991.

- 127 LEFN, P.; LOPES, J. A.; DOMINGO, C et al. Evaluation of laboratory assays for screening antibody to hepatitis C virus. **Transfusion**, Philadelphia, v. 33, n. 3, p. 268-270, Mar. 1993.
- 128 LEON, A.; CANTON, R.; ELIA, M.; MATEOS, M. Second-generation RIBA to confirm diagnosis of HCV infection. **Lancet**, London, v. 337, p. 912, 1991.
- 129 LI, X. M.; REDDY, K. R.; JEFFERS, L. J. et al. Indeterminate hepatitis C. **Lancet**, London, v. 341, 1993.
- 130 LIN, C. K.; CHI, R.; LI, K. B. et al. A study of hepatitis C virus and serum alanine aminotransferase in blood donors in Hong Kong Chinese. **Vox Sang.**, Basel, v. 62, p. 98-101, 1992.
- 131 LIN-CHU, M.; TSAI, S.; WATANABE, J. et al. The prevalence of anti-HCV among chinese voluntary blood-donors in Taiwan. **Transfusion**, Philadelphia, v. 30, p. 471-473, 1990.
- 132 LUNEL, F.; VALLA, D.; THIERS, V. et al. Incidence élevée d'hépatites non A non B non C post-transfusionnelles dans une étude prospective parisienne. **Gastroenterol. Clin. Biol.**, Paris, v. 15, p. 897, 1991a.
- 133 LUNEL, F. Virus de l'hépatite C: le virus responsable de la plupart des hépatites non A non B. **Gastroenterol. Clin. Biol.**, Paris, v. 16, p. 526-536, 1992.
- 134 LUNEL, F.; AZAR, N.; FOURNEL, J. et al. Anticorps anti-VHC et receveurs de produits sanguins: résultats préliminaires d'une enquête prospective effectuée dans un CHU parisien. **Rev. FR. Transfus. Hemobiol.**, Paris, v. 33, p. 361-367, 1990.
- 135 LUNEL, F.; PAYNE, J.; AUBRIT, F. et al. Comparaison de la sensibilité de deux tests ELISA de deuxième génération (Ortho HCV ELISA et Monolisa HCV) et du test de confirmation RIBA dans une série de 211 patients avec hépatite chronique non A non B. **Gastroenterol. Clin. Biol.**, Paris, v. 15, p. 909, 1991b. Abstract.
- 136 LUZZI, J. R.; NEVES, P. A.; SCHALCH, A. L. O. et al. Comparação dos testes de primeira e segunda geração para detecção de anti-HCV em doadores de sangue. **Rev. Bras. Med.**, v. 49, n. 1/2, jan/fev. 1992.
- 137 MARCELLIN, P.; MARTINOT-PEIGNOUX, M.; BOYER, N. et al. Second generation (RIBA) test in diagnosis of chronic hepatitis C. **Lancet**, London, v. 337, p. 551-552, 1991.

- 138 MARTIN, P. Hepatitis C: evaluating the seropositive blood donor. **Hepatology**, Baltimore, v. 15, n. 5, p. 967-969, 1992.
- 139 MATHIESEN, L. R., SKINHOS, P.; HARDT, F. et al. Epidemiology and clinical characteristics of acute hepatitis types A, B, and non A, B and non A non B. **Scand. J. Gastroenterol.**, Oslo, v. 14, p. 849-856, 1979.
- 140 MATSSON, L.; GUTIERREZ, RCOELARQ SON, G. J. et al. Antibodies to recombinant and synthetic peptides derived from the hepatitis C virus genome in long-term-studied patients with posttransfusion Hepatitis C. **Scand. J. Gastroenterol.**, Oslo, v. 26, p. 1257-1262, 1991.
- 141 MCFARLANE, I.; SMITH, H., JOHNSOM, P. et al. Hepatitis C virus antibodies in chronic active hepatitis: pathogenetic factor or false-positive result? **Lancet**, London, v. 335, p. 754-757, 1990.
- 142 MCHUTCHINSON, J. G.; PERSON, J. L.; GOVINDARAJAN, S. et al. Improved detection of hepatitis C virus antibodies in high-risk population. **Hepatology**, Baltimore, v. 15, p. 19-25, 1991.
- 143 MCHUTCHINSON, J. G.; KUO, G.; HOUGHTON, M. et al. Hepatitis C virus antibodies in acute icteric and chronic non-A, non-B hepatitis. **Gastroenterology**, New York, v. 101, p. 1117-1119, 1991.
- 144 MENITOVE, J.; RICHARDS, W.; DESTREE, M. Early US experience with anti-HCV kit in blood donors. **Lancet**, London, v. 336, p. 244-245, 1990.
- 145 MEHTA, S. U.; MISHIRO, S.; SEKIGUCHI, K. et al. Immune response to GOR, a marker for non-A, non-B hepatitis and its correlation with hepatitis C virus infection. **J. Clin. Immunol.**, New York, v. 12, n. 3, May 1992.
- 146 MEZZELANI, P.; VENTURINI, L.; TURRINA, G. et al. Detection of serum hepatitis C virus RNA in acute non A non B hepatitis. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 163, p. 923, 1991.
- 147 MIMMS, L.; VALLARI, D.; DUCHARME, L. et al. Specificity of anti-HCV ELISA assessed by reactivity to three immunodominant HCV regions. **Lancet**, London, v. 336, p. 1590-1591, 1990.
- 148 MISHIRO, S.; HOSHI, Y.; TAKEDA, K. Non A non B hepatitis specific antibodies directed of host-derived epitope: implications for an autoimmune prcess. **Lancet**, London, v. 336, p. 1400-1403, 1990.

- 149 MITSUI, T.; IWANO, K.; MAZUKO, K. et al. Hepatitis C virus infection in medical personnel after needlestick accident. **Hepatology**, Baltimore, v. 16, n.5, p. 1109-1114, Nov. 1992.
- 150 MOSLEY, J.W.; AACH, R.D.; HOLLINGER, B. et al. Non A, non B hepatitis and antibody to hepatitis C virus. **JAMA**, Chicago, v. 263, p. 77-78, 1990.
- 151 NAKASHIMA, K.; KASHIWAGI, S.; HAYASHI, J. et al. Low prevalence of hepatitis C virus infection among hospital staff and acupuncturists in Kyushu, Japan. **J. Infect.**, London, v. 26, n. 1, p. 17-25, Jan. 1993.
- 152 NAKATSUJI, Y.; MATSUMOTO, A.; TANAKA, E. et al. Detection of chronic hepatitis C virus infection by four diagnostic systems: first-generation and second generation enzyme-linked immunosorbent assay, second-generation recombinant immunoblot assay and nested polymerase chain reaction analysis. **Hepatology**, Baltimore, v. 16, p. 300-305, 1992.
- 153 NISHIMURA, Y.; YAMAGUSHI, K.; WILLIAMS, N. et al. Antibodies to hepatitis C virus in Japanese blood donors and in hospital personnel. **Transfusion**, Philadelphia, v. 30, p. 667-668, 1990.
- 154 NORKRANS, G.; FROSNER, G.; HERMODSSON, S. et al. Clinical epidemiological and prognostic aspects of hepatitis "non A non B", a comparison with hepatitis A and B. **Scand. J. Infect. Dis.**, Stockholm, v. 11, p. 259-264, 1979.
- 155 NORRGREN, H.; FLODMAN-NORRLUND, I. G.; LINDHOLM, T. et al. Prevalence of antibodies against hepatitis B and C viruses among different groups of medical staff. **Scand. J. Infect. Dis.**, Stockholm, v. 24, n. 4, p. 553-554, 1992.
- 156 OKAMOTO, H.; TSUDA, F.; MACHIDA, A. et al. Antibodies against synthetic oligopeptides deduced from the putative core gene for the diagnosis of hepatitis C virus infection. **Hepatology**, Baltimore, v. 15, p. 180-186, 1991.
- 157 PAABO, S.; WILSON, A. C. Polymerase chain reaction cloning artefacts. **Nature**, London, v. 334, p. 387-388, 1988.
- 158 PACHUCKI, C. T.; LENTINO, J. R.; SCHAAFF, D. et al. Low prevalence of sexual transmission of hepatitis C virus in sex partners of seropositive intravenous drug users. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 164, p. 820-821, 1991.
- 159 PAPPAS, S.; HOOFNAGLE, J.; YOUNG, N. et al. Treatment of chronic non A non B hepatitis with acyclovir: pilot study. **J. Med. Virol.**, New York, v. 15, p. 1-9, 1985.

- 160 PATTI, A. M.; SANTI, A. L.; POMPA, M. G. et al. Viral hepatitis and drugs: a continuing problem. *Int. J. Epidemiol.*, v. 22, n. 1, p. 135-139, Feb. 1993.
- 161 PEREZ TRALLERO, E.; CILLA, G.; ALCORTA, M. et al. Bajo riesgo de adquisición del virus de la hepatitis C para el personal sanitario. *Med. Clin.*, Barcelona, v. 99, n. 16, p. 609-611, Nov. 1992.
- 162 PERSING, D. H. Polymerase chain reaction: trenches to benches. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v. 29, p. 1281-1285, 1991.
- 163 POZZATO, G.; MORETTI, M.; FRANZIN, F. et al. Severity of liver disease with different hepatitis C viral clones. *Lancet*, London, v. 338, p. 509, 1991.
- 164 PRINCE, A. M.; BROTMAN, B.; GRADY, G. F. et al. Long-incubation post-transfusion hepatitis without serological evidence of exposure to hepatitis B virus. *Lancet*, London, v. 2, p. 241-246, 1974.
- 165 PROHASKA, W.; KLEESIEK, K. Treatment of chronic hepatitis C with inosine pranobex. *Lancet*, London, v. 338, p. 390-391, 1991.
- 166 RAKELA, J.; REDEKER, A. G.. Chronic liver disease after acute non A non B viral hepatitis. *Gastroenterology*, New York, v. 77, p. 1200-1202, 1979.
- 167 REESINK, H. W.; WONG, V. C. W.; IP, H. M. H. et al. Mother-to-infant transmission and hepatitis C virus. *Lancet*, London, v. 335, p. 1216-1217, 1990.
- 168 REICHARD, O.; ANDERSSON, J.; SCHVARCZ, R. et al. Ribavirin treatment for chronic hepatitis C. *Lancet*, London, v. 337, p. 1058-1061, 1991.
- 169 REINUS, J. F.; LEIKIN, E. L.; ALTER, H. J. et al. Failure to detect vertical transmission of hepatitis C virus. *Ann. Intern. Med.*, Philadelphia, v. 117. n. 11, p. 881-886, Dec. 1992.
- 170 RESNICK, R. H.; STONE, K.; ANTONIOLDI, D. Primary hepatocellular carcinoma following non A non B post-transfusion hepatitis. *Dig. Dis. Sci.*, New York, v. 28, p. 908-911, 1983.
- 171 RICCHI, E.; BORDERI, N.; COSTIGLIOLA, P. et al. Anti-hepatitis C virus antibodies amongst italian homo-bisexual males. *Eur. J. Epidemiol.*, v. 8, n. 6, p. 804-807, Nov. 1992.

- 172 RICHARDS, R.; HOLLAND, P.; KURANOTO, K. et al. Prevalence of antibody to hepatitis C virus in a blood donor population. **Transfusion**, Philadelphia, v. 32, p. 109-113, 1991.
- 173 RODRIGUEZ, M.; RUESTA, S.; SAN ROMÁN, F. et al. Prevalence of antibody to hepatitis C virus in acute non A, non B hepatitis in patients from different epidemiological categories. **Arch. Virol. Suppl.**, Amsterdam, v. 4, p. 319-320, 1992.
- 174 RODRIGUEZ, M.; TÉVAR, F. Second-generation tests for hepatitis C virus. **Ann. Intern. Med.**, Philadelphia, v. 115, n. 9, p. 747-748, Nov. 1991.
- 175 ROMEO, J.; ULRICH, P.; BUSCH, M. P. et al. Analysis of hepatitis C virus RNA prevalence and surrogate markers of infection among seropositive voluntary blood donors. **Hepatology**, Baltimore, v. 17, p. 188-195, 1993.
- 176 ROMEO, J.; ULRICH, P.; VYAS, G. N. Detection of hepatitis C virus in blood donors reactive and nonreactive for antibodies. **Transfusion**, Philadelphia, v. 31, p. 780, 1991.
- 177 ROSENBAUM, J.; CARNEIRO, B.; DHUMEAUX, D.; TREPO, C. Hépatites virales non A non B. **Gastroenterol. Clin. Biol.**, Paris, v. 8, p. 273-287, 1984.
- 178 SAKAMOTO, N.; SATO, C.; HARITANI, H. et al. Detection of hepatitis C viral RNA in sporadic acute non A non B hepatitis by polymerase chain reaction. It's usefulness for the early diagnosis of seronegative infection. **J. Hepatol.**, Amsterdam, v. 17, n. 1, p. 28-33, Jan. 1993.
- 179 SCHRUMPF, E.; ELGJO, K.; FAUSA, O. et al. The significance of hepatitis C antibodies measured in chronic liver disease. **Scand. J. Gastroenterol.**, Oslo, v. 25, p. 1169-1174, 1990.
- 180 SCHVARTZ, R.; GLAUMANN, H.; WEILAND, O. et al. Histological outcome in interferon alpha-2b treated patients with chronic posttransfusion non A non B hepatitis. **Liver**, Copenhagen, v. 11, p. 30-38, 1991.
- 181 SERFATY, L.; GIRAL, P.; ELGHOUZZI, M. H. et al. Risk factors for hepatitis C virus infection in hepatitis C virus antibody ELISA-positive blood donors according to RIBA-2 status: a case-control survey. **Hepatology**, Baltimore, v. 17, p. 183-187, 1993.
- 182 SHERLOCK, S. Virus hepatitis B, A, non A, non B. **J. Hepatol.**, Amsterdam, v.8, p. 254-258, 1989.
- 183 SHERLOCK, S.; DUSHEIKO, G. Hepatitis virus updated. **Gut**, London, v. 32, p. 965-967, 1991.

- 184 SHEU, J. C.; WANG, J. T.; WANG, T. H. et al. Prevalence of hepatitis C viral infection in a community in Taiwan. Detection by synthetic peptide-based assay and polymerase chain reaction. *J. Hepatol.*, Amsterdam, v. 17, n. 2, p. 192-198, Feb. 1993.
- 185 SHINDO, M.; DI BISCEGLIE, A. M.; HOOFNAGLE, J. H. Long-term follow-up of patients with chronic hepatitis C treated with alpha interferon. *Hepatology*, Baltimore, v. 15, p. 1013-1016, 1992.
- 186 SIMMONS, P.; QI ZHANG, L.; WATSON, H. G. et al. Hepatitis C quantification and sequencing in blood products, haemophiliacs, and drug users. *Lancet*, London, v. 336, p. 1469-1472, 1990.
- 187 SIRCHIA, G.; ALMINI, D.; BELLOBUONO, A. et al. Prevalence of hepatitis C virus antibodies in italian blood donors. *Vox Sang.*, Basel, v. 59, p. 26-29, 1990.
- 188 SOONG, S. J.; WHITLEY, R. J. Mother-to-child transmission of hepatitis C virus. *J. Infect. Dis.*, Chicago, v. 164, p. 427, 1991.
- 189 STEVENS, C. E.; TAYLOR, P. E.; PINDICK, J. et al. Epidemiology of hepatitis C virus. A preliminary study in volunteer blood donors. *JAMA*, Chicago, v. 263, p. 49-53, 1990.
- 190 STEVENS, C. E.; AACH, R. D.; HOLLINGER, B. F. et al. Hepatitis B virus antibody in blood donors and the occurrence of non A non B hepatitis in transfusion recipients. *Ann. Intern. Med.*, Philadelphia, v. 101, p. 733-738, 1984.
- 191 STOKES, P.; LOPEZ, W.; BALART, L.. Effects of short-term corticosteroid therapy in patients with chronic non A non B hepatitis. *Gastroenterology*, New York, v. 92, p. 1783, 1987. Abstract.
- 192 STRAUSS, E. Vírus da hepatite C é finalmente identificado. *Rev. Bras. Med.*, v. 47, p. 199-200, 1990.
- 193 STRAUSS, E. Hepatite C. In: MENDES, F.; PITELLA, A. M. *Recentes avanços em hepatites*. Fundo Editorial BYK, 1993. p. 79-88.
- 194 SUGITANI, M.; INCHAUSPE, G.; SHINDO, M. et al. Sensitivity of serological assays to identify blood donors with hepatitis C viraemia. *Lancet*, London, v. 339, p. 1018-1019, 1992.
- 195 TABOR, E.; GERETY, R. J.; DRUCKER, J. A. et al. Transmission of non A non B hepatitis, from man to chimpanzee. *Lancet*, London, v. 1, p. 463-466, 1978.

- 196 TANG, E. Hepatitis C virus. A review. **West. J. Med.**, San Francisco, v. 155, n. 2, p. 164-168, 1991.
- 197 TAKAMIZAWA, A; MORI, C.; FUKE, I. et al. Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers. **J. Virol.**, Amsterdam, v. 65, p. 1105-1113, 1991.
- 198 TINE, F.; MAGRIN, S.; CRAXI, A. et al. Interferon for non A non B chronic hepatitis. A meta-analysis of randomised clinical trial. **J. Hepatol.**, New York, v. 13, p. 192-199, 1991.
- 199 THEILMANN, L.; BLAZEK, M.; GOESE, R. et al. False positive anti-HCV tests in rheumatoid arthritis. **Lancet**, London, v. 335, p. 1346, 1990.
- 200 TOLEDO, J. A. **Hepatitis não A não B**. 1. ed. Rio de Janeiro : Cultura Médica, 1988.
- 201 TONG, C. Y.; CODD, A. A. RIBA-2 band intensity and PCR in HCV infection. **Lancet**, London, v. 340, p. 117-118, 1992.
- 202 TREMOLADA, F.; CASARIN, C.; TAGGER, A. et al. Antibody to hepatitis C virus in post-transfusion hepatitis. **Ann. Intern. Med.**, Philadelphia, v. 114, p. 277-281, 1991.
- 203 TREPO, C. Des hépatites non-A non-B au virus de l'hépatite C. **Gastroenterol. Clin. Biol.**, Paris, v. 14, p. 51-53, 1990.
- 204 _____. L'identification du virus de l'hépatite C, (VHC), un progrès décisif pour la santé publique. **Méd. Sci.**, v. 6, p. 98-107, 1990.
- 205 TREPO, C.; DEGOS, F.; DEGOTTE, C. et al. Transmission of B like non A non B hepatitis and associated markers to chimpanzees successfully immunized against HBV. **Hepatology**, Baltimore, v. 2, p. 686, 1982. Abstract.
- 206 TREPO, C.; LINDBERG, J. Non A, non B hepatitis. **Scand. J. Gastroenterol.**, Oslo, v. 17, suppl. 17, p. 75-92, 1982.
- 207 TREPO, C.; VITVITSKI, L.; DEGOS, F. et al. Correlation between hepatitis non A non B and hepatitis B markers: further evidence suggestive of a relationship between two distinct agents. In: OVERBY, L. R.; DEINHARDT, J.; DEINHARDT, F. (ed.). **Viral hepatitis**. New York, 1983. p. 137-140.
- 208 TREPO, C.; VITVITSKI, L.; HANTZ, C. et al. Identification and detection of long incubation non A non B hepatitis virus and associated antigens or antibodies. **J. Virol. Methods.**, Amsterdam, v. 2, p. 127-139, 1980.

- 209 UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Biblioteca Central. **Normas para apresentação de trabalhos. Parte 2. Teses, dissertações e trabalhos acadêmicos.** 2.ed. Curitiba : Ed. da UFPR : Governo do Estado do Paraná, 1992.
- 210 _____. **Normas para apresentação de trabalhos. Parte 6. Referências bibliográficas.** 2.ed. Curitiba : Ed. da UFPR : Governo do Estado do Paraná, 1992.
- 211 _____. **Normas para apresentação de trabalhos. Parte 7. Citações e notas de rodapé.** 2.ed. Curitiba : Ed. da UFPR : Governo do Estado do Paraná, 1992.
- 212 _____. **Normas para apresentação de trabalhos. Parte 8. Estilo e orientação para datilografia e digitação.** 2.ed. Curitiba : Ed. da UFPR : Governo do Estado do Paraná, 1992.
- 213 VAN DER POEL, C. L.; REESNICK, H. W.; LELIE, P. N. Anti-HCV and transaminases testing of blood donors. **Lancet**, London, v. 336, p. 187-188, 1990a.
- 214 VAN DER POEL, C. L.; LELIE, P. N.; CHOO, Q. L. et al. Anti-hepatitis C antibodies and non A non B post-transfusion hepatitis in the Netherlands. **Lancet**, London, v. 2, p. 297-298, 1989.
- 215 VAN DER POEL, C. L.; CUYPERS, H. T. M.; REESINK, H. W. et al. Confirmation of hepatitis C virus infection by new four-antigen recombinant immunoblot assay. **Lancet**, London, v. 337, p. 317-319, 1991.
- 216 VAN DER POEL, C. L.; REESINK, H. M.; SHAASBERG, W. et al. Infectivity of blood seropositive for hepatitis C virus antibodies. **Lancet**, London, v. 335, p. 558-560, 1990b
- 217 VAN DOORNUM, G. J. J.; HOOYKAAS, C.; CUYPERS, M. T. et al. Prevalence of hepatitis C virus infection among heterosexuals with multiple partners. **J. Med. Virol.**, New York, v. 35, p. 22-27, 1991.
- 218 VILADOMIU, L.; GENESCA, J.; ESTEBAN, J. et al. Interferon alpha in acute posttransfusion hepatitis C: a randomized, controlled trial. **Hepatology**, Baltimore, v. 15, p. 767-769, 1992.
- 219 VITVITSKI, L.; LI, J. S.; TONG, S. P.; PEDROSO, M. L.; LAURENT, F.; TREPO, C. Detection fo HCV RNA in liver biopsies by PCR: a more reliable marker of persistent viral infection than serum detection. In: **THIRD INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON HCV**, p.36, Sep. 1991.
- 220 WANG, T. H.; WANG, J. T.; LIN, J. T.; SHEU, J. C.; SUNG, J. L.; CHEN, D. S. A prospective study of posttransfusion hepatitis in Taiwan. **J. Hepatol.**, Amsterdam, v. 13, p. 38-43, 1991.

- 221 WAUMANS, L.; CLAEYS, H; VERHAERT, H. et al. Hepatitis C virus confirmation in blood donor screening. **Vox Sang.**, Basel, v. 64, p. 145-149, 1993.
- 222 WEILAND, O.; SCHVARCZ, R. Hepatitis C : virology, epidemiology, clinical course, and treatment. **Scand. J. Gastroenterol.**, Sweden, v. 27, p. 337-342, 1992.
- 223 WEINER, A. J.; TRUETT, M. A.; HAN, J. et al. HCV testing in low-risk population. **Lancet**, London, v. 336, p. 695, 1990.
- 224 WENDEL, S.; LUZZI, J. R.; RUSSO, C. et al. Pesquisa de anti-HBc em doadores de sangue em São Paulo: deve esse teste ser adotado no Brasil? **Rev. Paul. Med.**, São Paulo, v. 109, p. 77-83, 1991.
- 225 WENDEL, S.; KUO, G.; BRADLEY, D. W. et al. Detection of hepatitis C viral sequences in non A, non B hepatitis. **Lancet**, London, v. 335, p. 1-3, 1990b.
- 226 WILLIAMS, A. E.; DODD, R. Y. The serology of hepatitis C virus in relation to post-transfusion hepatitis. **Ann. Clin. Lab. Sci.**, Philadelphia, v. 20, p. 192-199, 1990.
- 227 WONG, D; DIWAN, A; ROSEN, L. et al. Non-specificity of anti-HCV test for seroepidemiological analysis. **Lancet**, London, v. 336, p.750-751, 1990.
- 228 WRIGHT, T. L.; HSU, H.; DENEGAN, E. et al. Hepatitis C virus not found in fulminant non A non B hepatitis. **Ann. Intern. Med.**, Philadelphia, v. 115, p. 111-112, 1991.
- 229 YANAGI, M.; KANEKO, S.; UNOURA, M. et al. Hepatitis C virus in fulminant hepatic failure. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 324, p. 1895, 1991.
- 230 YOUSUF, M.; NAKANO, E.; TANAKA, E. et al. Persistence of viremia with type C chronic hepatitis during long term follow-up. **Scand. J. Gastroenterol.**, Oslo, v. 27, p. 812-816, 1992.
- 231 YUN, Z. B.; LINDH, G.; WEILAND, O. et al. Detection of hepatitis C virus RNA by PCR related to HCV antibodies in serum and liver histology in Swedish blood donors. **J. Med. Virol.**, New York, v. 39, p. 57-61, 1993.
- 232 ZAAIJER, H. L.; CUYPERS, H. T. M.; REESINK, H. W. et al. Reliability of polymerase chain reaction for detection of hepatitis C virus. **Lancet**, London, v. 341, p. 722-724, 1993.
- 233 ZUCKERMAN, A. J. Hepatitis C virus: a giant leap forward. **Hepatology**, Baltimore, v. 11, n.2, p. 320-322, 1990.